

IJzerchelatie en ijzerafgifte uit de lever

Iron chelation and iron mobilization from the liver

Proefschrift

ter verkrijging van de graad van doctor
aan de Erasmus Univeriteit Rotterdam
op gezag van de rector magnificus
Prof. dr. A.H.G. Rinnooy Kan
en volgens besluit van het college van dekanen.
De openbare verdediging zal plaatsvinden op
woensdag 7 juni 1989 om 15.45 uur

door

Leendert Jacob Mostert

geboren te Maassluis

ICG Printing
Dordrecht

Promotiecommissie

Promotoren	:	Prof. dr. H.G. van Eijk Prof. dr. J.F. Koster
Overige leden	:	Prof. J.H.P. Wilson Prof. dr. J. van Gool

Aan mijn ouders
Voor Hanneke

Het in dit proefschrift beschreven onderzoek is verwerkt in een aantal publicaties en abstracts.

Publicaties

1. Iron mobilization from isolated hepatocytes.
L.J. Mostert, G. de Jong, J.F. Koster, H.G. van Eijk.
Int. J. Biochemistry 18, 1986, 1061-1064.
2. Free radical and cytotoxic effects of chelators and their iron complexes in the hepatocyte.
L.J. Mostert, J.A.L.M. van Dorst, J.F. Koster, H.G. van Eijk en G.J. Kontoghiorghe.
Free Radical Res Comms. 6, 1987, 379-388.
3. Studies on ferritin in rat liver and spleen after repeated phlebotomy.
L.J. Mostert, M.I. Cleton, W.C. de Bruijn, J.F. Koster, H.G. van Eijk.
Int. J. Biochemistry 21, 1989, 39-47.
4. Over ijzerchelatie.
L.J. Mostert, J.F. Koster, H.G. van Eijk.
Tijdschrift van de Nederlandse Vereniging voor Klinische Chemie, November 1988.

Abstracts

1. Iron mobilization from isolated hepatocytes.
L.J. Mostert, J.F. Koster, H.G. van Eijk.
European Iron Club 1985, Amersfoort, Holland.
2. Ijzerchelatie en lipideperoxidatie.
L.J. Mostert, J.A.L.M. van Dorst, J.F. Koster, H.G. van Eijk.
Federatie Medisch Wetenschappelijke Verenigingen 1986, Groningen.
3. Iron chelators and lipid peroxidation
L.J. Mostert, J.F. Koster, H.G. van Eijk.
European Iron Club 1986, Pavia, Italy.
4. IJzermobilisatie na herhaalde flebotomie.
L.J. Mostert, M.I. Cleton, J.F. Koster, H.G. van Eijk.
Federatie Medisch Wetenschappelijke Verenigingen 1987, Nijmegen.

Overige publicaties

1. van der Kraaij, A.M.M., Mostert, L.J., van Eijk, H.G., Koster, J.F. Iron-load increases the susceptibility of rat hearts to oxygen reperfusion damage. Protection by the antioxidant (+)-cyanidanol-3 and desferrioxamine. *Circulation* 78, 442-448, 1988.
2. Cleton, M.I., Mostert, L.J., Sorber, L.W.J., de Jong, A.A.W., de Jeu-Jaspars, C.M.H., de Bruijn, W.C. Effect of phlebotomy on the (ferritin) iron content in the rat liver as determined morphometrically with the use of Electron Energy Loss Spectroscopy. treatment. *Cell and Tissue Research*, in press.

Inhoudsopgave

Lijst van gebruikte afkortingen	8
Hoofdstuk 1.	12
1.1. Inleiding	12
1.1.1. Kort overzicht van de ijzerstofwisseling	12
1.2. IJermobilisatie	16
1.3. IJzerstapelingsziekten	17
1.3.1. Primaire (of idiopathische) hemochromatose	17
1.4. De toxiciteit van ijzer	21
1.5. IJzerchelatoren	25
1.6. Probleemstelling	28
Hoofdstuk 2.	36
2.1. Materiaal en Methoden.	36
2.2. Chemicaliën	36
2.3. Isotopen	36
2.4. Radioactief merken van rattehepatocyten	36
2.5. Enzymperfusie van de rattelever met collagenase	36
2.6. Ruwe schatting van de levensvatbaarheid van de geïsoleerde hepatocyten	37
2.7. Controle van de levensvatbaarheid van de geïsoleerde hepatocyten met een LDH- meting	38
2.8. Isolatie van ratteleverferritine	39
2.9. Isolatie van rattemiltferritine.	40
2.10. Eiwitbepaling volgens Markwell	40
2.11. Eiwitbepaling volgens Bradford	41
2.12. Opladen van apo-ferritine met een mengsel van ^{59}Fe en ^{56}Fe	42
Hoofdstuk 3.	46
3.1. IJermobilisatie uit geïsoleerde hepatocyten	46
3.2. Materiaal en methoden	46
3.2.1. De bereiding van anemisch ratteserum	46
3.2.2. Rattetransferrine	47
3.2.3. Anti-ratteleverferritine	47
3.2.4. Koppeling van anti-ratteleverferritine aan Sephacrose-CNBr	48
3.2.5. Radioactief gemerkte hepatocyten	49
3.2.6. Incubatie experimenten	49
3.2.7. Bereiding van het 100.000 g cytosol uit rattehepatocyten	49
3.3. Resultaten	50
Hoofdstuk 4.	60
4.1. IJzerchelatoren en lipide-peroxidatie.	60
4.2. Materiaal en methoden	61
4.2.1. Chemicaliën	61
4.2.2. Evenwichtsdialyse van chelatoren tegen ^{59}Fe - gemerkt ferritine	61

4.2.3.	Inhibitie van microsomale lipide-peroxidatie geïnduceerd door middel van Fe^{3+} /ADP en NADPH	62
4.3.	Resultaten	65
4.3.1.	IJzermobilisatie uit ferritine	65
4.3.2.	Intracellulaire ijzeraccumulatie	65
4.3.3.	Lipide-peroxidatie	68
4.3.4.	IJzermobilisatie uit ^{59}Fe -gemerkte hepatocyten	68
4.4.	Discussie	69
Hoofdstuk 5		74
5.1	Bestudering van ferritine in rattelever en -milt gedurende flebotomie	74
5.2	Materiaal en methoden	75
5.2.1	Proefdieren	75
5.2.2	Bereiding van weefselhomogenaten	75
5.2.3	Bepaling van ferritine in weefselhomogenaten	76
5.2.4	Bepaling van de ijzersaturatie van ferritine	76
5.2.5	Electronen-microscopie	76
5.3	Resultaten	77
5.3.1	Hematologische gegevens	77
5.3.2	Ferritinegehalte in de lever en milt gedurende ijzeronttrekking	79
5.3.3	IJzersaturatie van ferritine in de lever en milt van normale ratten na ijzeronttrekking	79
5.3.4	Electronen-microscopie	79
5.4	Discussie	82
Hoofdstuk 6.		96
6.1.	Algemene discussie	96
Hoofdstuk 7.		103
7.1.	Samenvatting	103
7.2.	Summary.	106
Nawoord		109
Curriculum vitae		111

Lijst van gebruikte afkortingen

2,3-DHB	2,3-dihydroxybenzoezuur
5-HP	5-hydroxypyridine-2-carboxyaldehydethio- semicarbazon
BAL	dimercaprol (British Anti-Lewisite)
BSA	bovine serum albumin
CHA	cholhydroxaamzuur
DFO	desferrioxamine
DHEG	N,N-dihydroxyethylglycine
DTPA	diethyleentriaminopentaazijnzuur
EDDHA	ethyleendiaminodi(o-hydroxyphenylazijnzuur)
EDTA	ethyleendiaminotetraazijnzuur
EELS	electron energy loss spectroscopy
ESI	electron spectroscopic imaging
E.S.R.	electron spin resonance
FAD(H ₂)	(gereduceerd) flavine adenine dinucleotide
GSH	glutathion (gereduceerd)
GSSH	geoxideerd glutathion
Hb	hemoglobine
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperaziny]-ethaan sulfonzuur
i.m.	intramusculair
i.p.	intraperitoneaal
i.v.	intraveneus
L1	1,2-dimethyl 3-hydroxypyrid-4-on
L4	2-hydroxypyridine-N-oxide
L6	2-hydroxy 4-methoxypyridine-N-oxide
MDA	malondialdehyde
n	aantal waarnemingen
NAD(H)	(gereduceerd) nicotinamide adenine dinucleotide
PIH	pyridoxalisonicotinoylhydrazon
RES	reticulo-endotheliaalsysteem
s.c.	subcutaan
SD	standaarddeviatie

SDS	natriumdodecylsufaat
SOD	superoxide dismutase
Tf	transferrine
Tris	trishydroxyaminomethaan

Hoofdstuk 1

Hoofdstuk 1.

1.1. Inleiding

1.1.1. Kort overzicht van de ijzerstofwisseling

IJzer is noodzakelijk voor een groot aantal biologische processen in het menselijk lichaam. De grootste hoeveelheid ijzer is geïncorporeerd in hemoglobine (60-70%), 20-30% is ingebouwd in ferritine van lever en milt, ongeveer 10 % is gebonden in myoglobine in de spiercellen, ongeveer 1% van het ijzer is gebonden in intracellulaire enzymen (cytochromen, katalasen), terwijl slechts 0.1% gebonden is aan transferrine (Tabel I).

Tabel I.

De verdeling van de totale hoeveelheid ijzer (4-5 gram) in het lichaam van een man van 75 kg.

60 - 70 %	hemoglobine
20 - 30 %	ferritine in lever en milt
± 10 %	myoglobine
± 1 %	hemosiderine (lever, RES)
± 0.3 %	enzymen (cytochromen, peroxidasen, ferredoxinen)
± 0.1 %	transferrine

IJzer wordt in geringe mate door het lichaam opgenomen, ca. 1.5 mg per dag, en in dezelfde hoeveelheid uitgescheiden. In de normale situatie is er evenwicht tussen ijzeropname en -verlies. De regulatie van het ijzermetabolisme vindt plaats door variatie van de ijzerabsorptie in de darm. Er is geen ijzer-excretiemechanisme via de gal of de urine. Ijzerverlies treedt op door fysiologische desquamatie van ijzerbevattende cellen van de darmmucosa en de huid.

Ferroverbindingen worden onder aerobe condities bij neutrale pH gemakkelijk omgezet in ferriverbindingen. $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$ en $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$

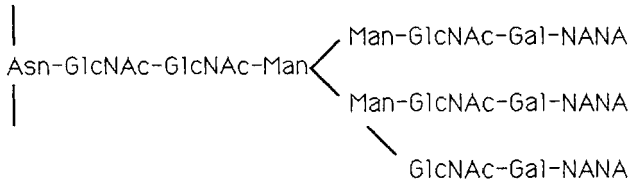
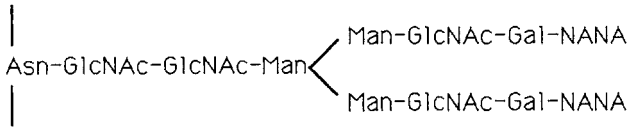
zijn stabiel in zure waterige oplossingen; wanneer de pH wordt verhoogd worden er protonen afgesplitst waarbij ijzerhydroxide wordt gevormd. Het oplosbaarheidsproduct van ijzerhydroxide is $10^{-38.7}$ bij 25°C en pH 7. Dit betekent dat bij deze pH 7 slechts 10^{-18} M Fe^{3+} in oplossing kan zijn. Echter in plasma komt ijzer voor in een concentratie van 10–30 μM hetgeen zeer veel hoger is dan op grond van het oplosbaarheidsproduct verwacht mag worden.

In plasma wordt ijzer getransporteerd door een speciaal eiwit, transferrine. Transferrine is een glycoproteïne dat is opgebouwd uit een enkele polypeptide keten en behoort tot de β -globulinefractie. Het ijzervrije eiwit, apo-transferrine, heeft een molecuulmassa van 79550¹. Transferrine heeft twee bindingsplaatsen voor ijzer, een in het N-terminale domain (Tf B-plaats) en een in het C-terminale domain (Tf A-plaats). In plasma is transferrine bij gezonde individuen ongeveer voor 30% verzadigd met ijzer. Er zijn aanwijzingen dat er fysisch-chemische verschillen zijn tussen A- en B-monoferritransferrine op grond van E.S.R.-spectra^{2,3,4}. Tevens zou er een functioneel verschil bestaan wat betreft de afgifte van ijzer. TfFe(A) zou voornamelijk ijzer afgeven aan de voorlopers van de erythrocyt terwijl TfFe(B) zijn ijzer voornamelijk aan de opslagplaatsen in het lichaam zou afstaan^{5,6}. Transferrine zou hierdoor een regulerende rol spelen in de ijzerstofwisseling. Van der Heul et al.^{7,8} toonden door middel van incubaties met erythroïde voorlopers aan dat met zowel TfFe(A) als TfFe(B) geen verschil optrad in ijzerafgifte aan deze cellen. Ook in vivo werd door van der Heul et al. aangetoond dat er geen verschil was in ijzerafgifte van TfFe(A) en TfFe(B)⁹.

Op het C-terminale domain van het transferrinemolecuul bevinden zich tevens twee koolhydraatketens welke gebonden zijn aan asparagine. Het koolhydraatgedeelte bestaat uit mannose, galactose, N-acetylglucosamine en N-acetylneuraminezuur (sialzuur)^{10,11,12,13}. Er zijn twee mogelijkheden wat betreft de opbouw van de koolhydraatketens. Deze kunnen biantennair of triantennair zijn (figuur 1). Vanwege de twee koolhydraatketens zijn er een aantal mogelijkheden wat betreft het aantal "antennes" van het

transferrinemolecuul, er kunnen twee biantennaire ketens, twee triantennaire ketens of een bi- en een triantennaire keten aan het transferrinemolecuul gebonden zijn (figuur 2). Deze koolhydraatketens hoeven niet noodzakelijkerwijs volledig gesialileerd te zijn. Als gevolg van verschillen in siaalzuurgehalte is een microheterogeniteit van het transferrine waargenomen. Op het ogenblik zijn 7 verschillende Tf-subfracties geïsoleerd m.b.v. preparatieve iso-electrofocusering¹⁴. Transferrine wordt zowel via een specifieke transferrinereceptor als een glycoproteïne-receptor opgenomen in de cel. Het vrijkomende ijzer wordt afhankelijk van het celtype gebruikt voor heemsynthese (erytroïde voorlopers) of als reserve opgeslagen in ferritine (o.a. hepatocyten).

Ferritine is een eiwit waarin ijzer dat niet direct gebruikt wordt, opgeslagen kan worden in non-toxische vorm. Ferritine heeft een molecuulmassa van 450.000 (in ijzervrije vorm, apo-ferritine) en kan tot 4500 Fe-atomen bevatten die als ferrioxhydroxidefosfaat $((\text{FeOOH})_8(\text{FeO}:\text{OPO}_3\text{H}_2))$ ¹⁵ gebonden worden. De ijzer-hydroxidekern is oplosbaar dankzij het feit dat deze omgeven is door een sferische eiwitmantel. De eiwitmantel is voorzien van 6 kanalen waardoor ijzeratomen de eiwitmantel kunnen binnenkomen en verlaten. Door röntgendiffractie-analyse van paardemiltferritine^{16,17,18} werd bekend dat ferritine uit 24 identieke subunits bestond, die met een hoge graad van symmetrie gerangschikt waren. De waarneming dat op gelelectroforese^{19,20} en iso-electrofocusering²¹ ferritine, geïsoleerd uit een bepaald orgaan, verschillende banden vertoonde leidde tot de hypothese dat ferritine opgebouwd is uit een combinatie van twee typen subunits, resp. een H- (heart, heavy, $M=21.000$) en een L-subunit (liver, light, $M=19.000$)²², met als combinaties L_0H_{24} , L_1H_{23} $L_{23}H_1$, $L_{24}H_0$ ²³. In de mens en bij de rat komen er isoferritines (=ferritines met verschillende pI's) voor in het gebied van 4.8-5.7 waarbij de hartferritines de meest zure en de lever de meest basische isoferritines bevatten.



figuur 1.

Schematische weergave van een bi- en een triantennaire oligosaccharideketen van humaan transferrine.

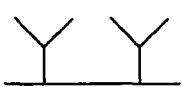
Asn = asparagine

GlcNAc = N-acetylglucosamine

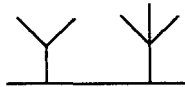
Man = mannose

Gal = galactose

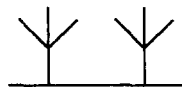
NANA = N-acetylneuraminezuur (sialzuur)



2x biantennair



1x bi- + 1x triantennair



2x triantennair

figuur 2.

Mogelijke combinaties van bi- en triantennaire koolhydraatketens van het transferrinemolecuul.

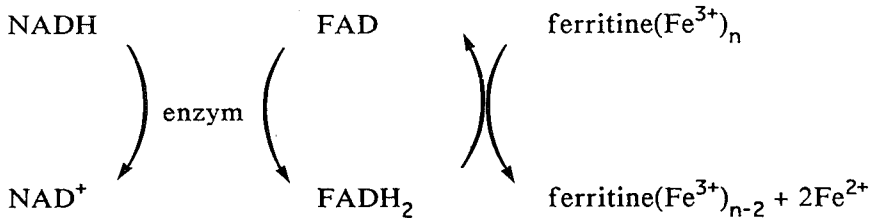
1.2. IJzermobilisatie

Er is nog steeds weinig bekend over de wijze waarop ijzer uit de ijzerdepots (ferritine, hemosiderine) wordt gemobiliseerd. In de literatuur zijn een aantal factoren beschreven die mogelijk betrokken zijn bij de ijzermobilisatie.

Mazur²⁴ veronderstelde dat xanthine oxidase betrokken was bij de in vivo mobilisatie van ijzer uit de lever. Deze veronderstelling berustte op de waarneming dat bij hemorrhagische of traumatische shock producten van het nucleotide katabolisme in het plasma verhoogd waren terwijl ook het plasma-ijzer verhoogd was. Er werd een relatie aangetoond tussen ijzerafgifte uit ferritine en het enzym xanthine-oxidase. Fridovich²⁵ suggereerde dat directe elektronenoverdracht van xanthine-oxidase naar het ferritine-ijzer verantwoordelijk was voor de ijzerreductie. De fysiologische stimulus voor een versnelde ijzerrelease uit ferritine in de weefsels is hypoxie. Gedurende een hypoxische toestand stijgt de hoeveelheid aan xanthine-oxidasesubstraten in het plasma en daardoor de hoeveelheid plasma-ijzer. Later werd aangetoond dat allopurinol, een xanthine-oxidase inhibitor, geen effect had op het ijzermetabolisme^{26,27}, zodat xanthine-oxidase als factor betrokken bij de ijzerafgifte onwaarschijnlijk is.

Ceruloplasmine is een koperbevattend enzym, dat ferroxidase-activiteit bezit, en in de literatuur beschreven als een factor betrokken bij de ijzer-mobilisatie^{28,29,30}. De waarneming dat bij ceruloplasmine-deficiënte varkens de afgifte van ijzer uit het RES werd verhinderd terwijl het plasma-ijzer steeg na toediening van ceruloplasmine leidde tot de volgende hypothese. Ijzer dat door reductie afkomstig was uit ferritine, werd door ceruloplasmine geoxideerd zodat binding met (apo-) transferrine mogelijk werd. Het exacte werkingsmechanisme van ceruloplasmine op de ijzermobilisatie is niet bekend³¹.

Osaki en Sirivech^{32,33} toonden aan dat ijzer uit ferritine kon worden gemobiliseerd in aanwezigheid van NADH, flavines en leverhomogenaat, waarbij de volgende mechanisme werd verondersteld:



Gezien de wijze waarop deze experimenten zijn uitgevoerd wordt deze hypothese betwijfeld.

In experimenten met geperfundeerde levers en geïsoleerde hepatocyten toonde Baker^{34,35,36,37} aan dat apo-transferrine zeer effectief ijzer kon mobiliseren. Mogelijk functioneerde het transferrine puur als een ijzeracceptor, echter transferrine mobiliseerde tweemaal zoveel ijzer als desferrioxamine ondanks de ongeveer gelijke ijzerbindingsconstante. Daarom werd een meer specifiek mechanisme verondersteld waarbij interactie van transferrine met membraanreceptoren is betrokken. Andere onderzoekers³⁸ zagen geen effect van transferrine op de ijzermobilisatie uit hepatocyten.

1.3. IJzerstapelingsziekten

1.3.1. Primaire (of idiopathische) hemochromatose

Primaire hemochromatose wordt veroorzaakt door een genetisch defect waardoor een verhoogde ijzerabsorptie optreedt. Per dag wordt dan ongeveer 3-5 mg ijzer geabsorbeerd (normaal 1.5 mg/dag) zodat de klinische verschijnselen van de ijzerstapeling, die zich manifesteren nadat 20-30 gram ijzer is geaccumuleerd, omstreeks het 40^e levensjaar optreden. De belangrijkste verschijnselen zijn hepatomegalie, pigmentatie van de huid en diabetes mellitus (diabète bronzé). De enorme ijzerstapeling in de lever leidt tot levercirrhose en vermindering van leverfunctie.

De behandeling van primaire hemochromatose is relatief eenvoudig. Wanneer regelmatig 200-250 mg (500 ml bloed) wordt verwijderd door flebotomie kunnen de klinische symptomen (Tabel II) worden voorkomen.

1.3.2. Secundaire hemochromatose

Secundaire hemochromatose wordt gekarakteriseerd door een progressieve ijzerstapeling als gevolg van regelmatige bloedtransfusies en/of verhoogde ijzerabsorptie. De belangrijkste groep patiënten met secundaire ijzerstapeling wordt gevormd door de thalassemie-patiënten. Thalassemie is een erfelijke afwijking in de hemoglobinesynthese waarbij de productie van of de α - (α -thalassemie) of de β -keten (β -thalassemie) verstoord is. Bij α -thalassemie is er in de foetus een overmatige productie van γ -ketens en bij de volwassenen een overmaat aan β -ketens. Echter de γ - en β -ketens kunnen oplosbare tetrameren vormen (Hb Bart's (γ_4) en HbH (β_4)) in de voorlopers van de erythrocyten. Deze Hb-varianten zijn niet zo stabiel als normaal Hb (Hb $\alpha_2\beta_2$) en precipiteren als de erythrocyt ouder wordt wat membraan beschadiging geeft en resulteert in hemolytische anemie. Bij α -thalassemie wordt de anemie veroorzaakt door de kortere levensduur van de erythrocyten terwijl de erytropoëse redelijk effectief is. Bij β -thalassemie is er een overmaat aan α -ketens die geen oplosbare tetrapolymeer kunnen vormen zodat deze snel in de voorlopers van de erythrocyt precipiteren. De erytropoëse is relatief ineffectief hetgeen resulteert in een anemie die de erytropoëtine productie stimuleert. Het lichaam probeert door middel van een verhoogde erytropoëse het Hb op peil te houden. Naast hepatomegalie en hypersplenisme zal ook extra-medullaire bloedaanmaak plaatsvinden (vergroting van de bloedvormende been-mergmassa in o.a. schedel). Ook is de ijzerabsorptie uit het maag-darmkanaal verhoogd wat verder bijdraagt aan de ijzerstapeling. Wanneer de anemie te ernstig wordt (Hb <7.5 mmol/l) wordt bloedtransfusie toegepast waardoor nog meer ijzer in het lichaam komt. Een unit bloed bevat ongeveer 200-250 gram ijzer zodat bloedtransfusie van 3 units bloed elke zes weken, per jaar in het lichaam 6-7 gram ijzer stapelt. De effecten van de ijzerstapeling treden pas op nadat ongeveer 20-30

gram ijzer (100-150 eenheden bloed) in het lichaam is geaccumuleerd hetgeen op een leeftijd van ± 20 jaar het geval is.

IJzeraccumulatie treedt op in de lever, endocriene organen en het hart. Een overzicht van de symptomen van secundaire hemochromatose is weergegeven in Tabel III.

In eerste instantie wordt ijzer opgeslagen in de cellen van het RES omdat de "versleten" ery's daar worden weggevangen en afgebroken. IJzerstapeling in deze cellen is niet pathologisch maar wanneer 10-15 units bloed zijn getransfundeerd is het transferrine in het serum verzadigd en wordt het ijzer ook afgezet in de parenchymale cellen^{39,40}. Daarnaast wordt uit het maag-darmkanaal geabsorbeerd ijzer dat gebonden is aan transferrine via de vena portae naar de hepatocyt getransporteerd wat leidt tot leverbeschadiging. Vroeger was het gebruikelijk om de ijzerstapeling te beperken door slechts op beperkte schaal bloedtransfusies toe te passen. Echter tegenwoordig geeft men de voorkeur aan een regelmatig bloedtransfusieschema waarbij het Hb op ongeveer 7.5 mmol/l wordt gehouden. Dit heeft het voordeel dat de kwaliteit van het leven verbeterd, de ontwikkeling van het kind bevordert en de gastro-intestinale ijzerabsorptie verlaagd wordt. Bloedtransfusies kunnen nog aanzienlijk verminderd worden door alleen jonge ery's te infunderen⁴¹ waardoor de geïnfundeerde ery's langer in de patiënt overleven.

Hoewel de hoeveelheid ijzer die afgezet wordt in het hart maar relatief klein is, is de voornaamste doodsoorzaak bij β -thalassemie de ijzerstapeling in het hart waardoor congestieve hartklachten, cardiomyopathie en aritmieën optreden. Deze klachten treden in het algemeen op bij een leeftijd van rond de 20 jaar. Het ijzer wordt afgezet in zowel de geleidende banen als het ventriculair myocard (linker ventrikel, linker atrium, linker ventriculair septum)⁴² waarbij ventriculaire aritmieën en progressieve cardiomyopathie optreden⁴³.

Tabel II

Klinische symptomen die optreden bij primaire hemochromatose⁴⁴.

- huidpigmentatie door verhoogde melanine afzetting
- diabetes mellitus
- hartinsufficiëntie
- leverafwijkingen
- hypogonadisme
- hepatomegalie
- artropathie
- ijzerafzetting in de parenchymcellen

Tabel III.

Klinische symptomen die optreden bij secundaire hemochromatose⁴⁵.

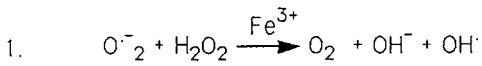
- ernstige anemie
- vertraagde groei
- vreemde huidskleur t.g.v. icterus, pallor en verhoogde melanine afzetting
- botdeformaties a.g.v. extra-medullaire bloedaanmaak
- cardiomyopathie
- hartinsufficiëntie
- hepatomegalie
- splenomegalie
- cardiomegalie
- verhoogde afzetting van ijzer in het RES

1.4. De toxiciteit van ijzer

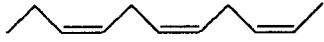
Het mechanisme dat ten grondslag ligt aan de toxiciteit van ijzer is nog steeds niet geheel duidelijk. Bij patiënten met ijzerstapeling is aangetoond dat de lysosomale enzymactiviteit is verhoogd en de lysosomale membranen erg kwetsbaar zijn⁴⁶. De enorme lysosomale ijzerstapeling zou dan verantwoordelijk zijn voor het kapot gaan van het lysosoom en de afgifte van proteolytische enzymen aan het cytoplasma waardoor de cel te gronde gaat. Arborg et al.⁴⁷ en Hultcrantz et al.⁴⁸ hebben inmiddels aangetoond dat bij ijzer-overladen ratten geen verhoging van de lysosomale enzymactiviteit optreedt. Ook wordt getwijfeld aan de fragiliteit van de lysosomale membraan bij ijzerstapeling.

Een andere hypothese die tegenwoordig in de belangstelling staat, gaat ervan uit dat bij overschrijding van de "normale" ijzeropslag-mechanismen (in ferritine, hemosiderine, transferrine) "vrij" ijzer in de cel aanwezig is waardoor vrije radicalen kunnen worden gegenereerd. Vrije radicalen hebben een oneven aantal electronen in de buitenste schil en zijn zeer reactief doordat zij zullen proberen een proton van een ander molecuul te abstraheren of een electron aan een ander molecuul te doneren.

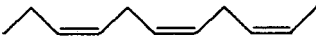
Sommige enzymreacties geven aanleiding tot de productie van het superoxide-anion ($O_2^{\cdot-}$) wat een gevaar voor de cel betekent. Het $O_2^{\cdot-}$ is in staat ijzer uit ferritine te mobiliseren dat als katalysator dient in de Haber-Weiss reactie (figuur 3) waarbij het nog veel reactievere hydroxylradicaal (OH^{\cdot}) wordt gevormd. Dit is schadelijk voor de cel vanwege de mogelijke interacties met eiwitten (resultierend in enzymoxidatie en -inactivatie), onverzadigde vetzuren⁴⁹ (resultierend in lipide-peroxidatie en veranderde membraanintegriteit) en nucleïne-zuren⁵⁰ (resultierend in DNA-crosslinking en DNA-breuk). Snelle afbraak van $O_2^{\cdot-}$ is essentieel voor de cel om te overleven omdat:



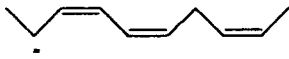
2. vetzuur met 3 dubbele bindingen



$-\text{H}^\cdot$



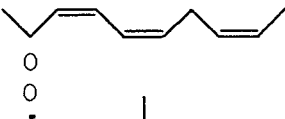
protonabstractie door bijv. OH^\cdot
gegenereerd in de Haber-Weiss
reactie



moleculaire herorientatie

O_2

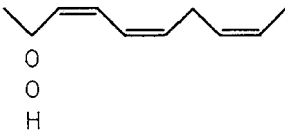
lipideradicaal



het lipideradicaal kan weer een
 H^\cdot abstraheren van een ander vet-
zuur (autokatalytische ketting-
reactie)

$+\text{H}^\cdot$

lipidehydroperoxide



Figuur 3.

1. Haber-Weiss reactie

2. Schematische weergave van het proces van lipide-peroxidatie

1. $O_2^{\cdot-}$ ijzer kan mobiliseren uit ferritine⁵¹
2. $O_2^{\cdot-}$ verder kan reageren via de Haber-Weiss⁵² reactie waarbij het nog reactievere hydroxylradicaal (OH^{\cdot}) wordt gevormd onder invloed van een kleine hoeveelheid ijzer^{53,54,55,56}

Lipide-peroxidatie is een complex proces dat in alle aerobe cellen optreedt en waarbij interactie plaatsvindt tussen moleculair zuurstof en onverzadigde vetzuren. Biologische membranen zijn rijk aan onverzadigde vetzuren en staan in contact met zuurstofrijk, metaalbevattende vloeistof. Om deze redenen zijn de membraanlipiden bijzonder ontvankelijk voor lipide-peroxidatie. Lipide-peroxidatie omvat een reeks van reacties waarbij de onverzadigde vetzuren worden afgebroken en vele secundaire radicalen en afbraakprodukten (waaronder malondialdehyde (MDA)) ontstaan. Lipide-peroxidatie wordt in verband gebracht met vele pathologische processen zoals veroudering, diabetes, atherosclerose, weefselfibrose, weefselnecrose en carcinogenese^{57,58}.

Het lichaam beschikt ook over beschermingsfactoren tegen vrije radicalen zodat de vorming van vrije radicalen niet altijd schadelijke gevolgen hoeft te hebben (Tabel IV).

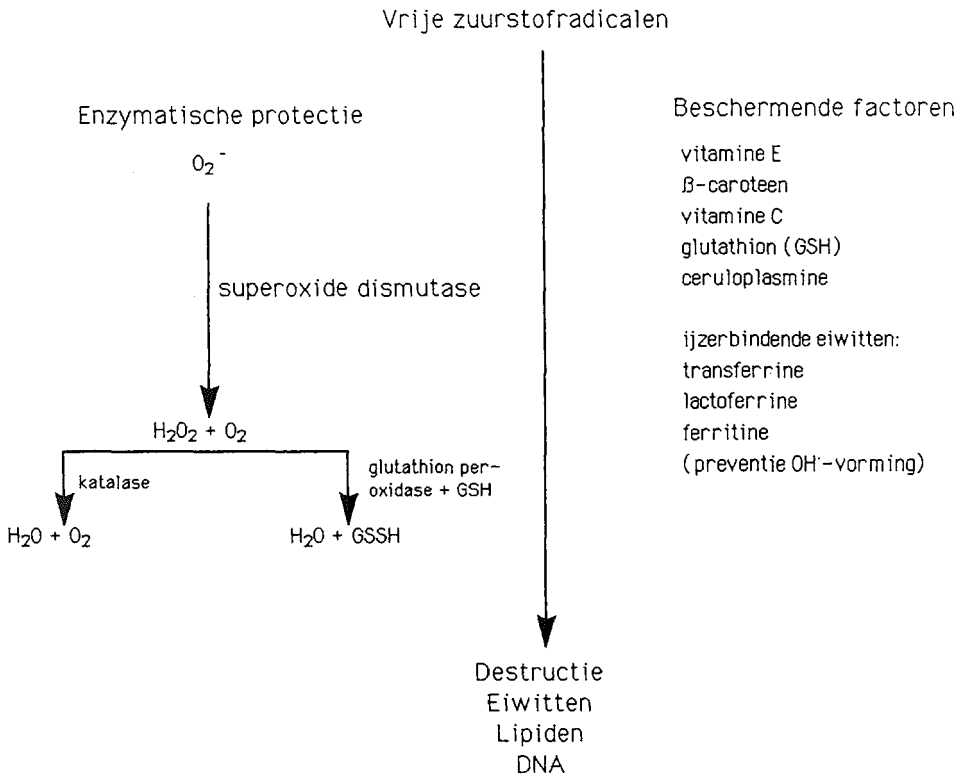
Enzymatische, en voornamelijk intracellulair voorkomende beschermingsfactoren zijn:

- superoxide dismutase (SOD) dat superoxide omzet in H_2O_2 .
- catalase dat H_2O_2 omzet in H_2O
- glutathion peroxidase dat in staat is om geperoxideerde vetzuren om te zetten in de hydroxy-vorm
- PIP (peroxidation inhibiting protein) dat geperoxideerde vetzuren in fosfolipiden kan omzetten in de hydroxyvorm.

Niet-enzymatische beschermingsfactoren zijn:

- α -tocopherol (vitamine E)
- GSH (gereduceerd glutathion) als co-factor voor glutathion peroxidase en PIP
- transferrine, lactoferrine, ferritine, hemosiderine voor ijzer-binding
- ceruloplasmine

Tabel IV.
Protectie tegen zuurstofradicalen.



1.5. IJzerchelatoren

Accumulatie van ijzer in verschillende organen is het grootste probleem bij anemische patiënten die regelmatig bloedtransfusies moeten ontvangen en is een van de belangrijkste oorzaken van de beperkte levensverwachting. Een eenvoudige behandeling als bij primaire hemochromatose in de vorm van regelmatige flebotomie is door de ernstige anemie niet mogelijk. Behandeling met een ijzerchelator is daarom de enige mogelijkheid om de gevolgen van de toxische ijzerstapeling te voorkomen of te verminderen.

In 1960 werd desferrioxamine (Desferal, Ciba-Geigy, Zwitserland), een ijzerchelator die door een gist (*Streptomyces pilosus*) in afwezigheid van ijzer in het groeimedium wordt geproduceerd, ontdekt. Hierdoor werd het mogelijk om overtollig ijzer dat door veelvuldige bloedtransfusies in het lichaam was gekomen te verwijderen^{59,60}. Desferrioxamine is een hydroxaamzuuranaloog en bindt specifiek Fe^{3+} maar is helaas niet oraal werkzaam. Wanneer desferrioxamine intramusculair (i.m.) wordt toegediend bevordert het de ijzerexcretie. Ongeveer 2/3 deel van het gebonden ijzer wordt uitgescheiden in de urine en 1/3 deel met de faeces⁶¹.

Verschillende onderzoeken^{62,63} hebben aangetoond dat parenterale toediening van (hoge) doses desferrioxamine aan thalassemiepatiënten een verhoogde ijzerexcretie teweeg brengt zodat bij een regelmatige toediening⁶⁴ van desferrioxamine een negatieve ijzerbalans kan worden bereikt. Vitamine C kan de ijzerexcretie aanzienlijk verhogen⁶⁵ echter voorzichtigheid is geboden omdat bij een te massale toediening de toxiciteit van "vrij" ijzer^a wordt verhoogd. Er zijn thalassemiepatiënten bekend die snel verslechterden na therapie met desferrioxamine en ascorbinezuur vermoedelijk als gevolg van de aanwezigheid van "vrij" ijzer⁶⁶.

Aanvankelijk werd desferrioxamine i.m. ingespoten maar er kon meer ijzer worden verwijderd wanneer desferrioxamine als een langzaam intraveneus infuus werd toegediend. Ook deze toedieningsvorm was

^a Onder "vrij" ijzer wordt verstaan het niet aan transferrine gebonden ijzer.

niet ideaal totdat ontdekt werd dat continue subcutane toediening even effectief was als dagelijkse i.v. infusen⁶⁷. Vanaf die tijd zijn kleine draagbare pompsystemen ontwikkeld waarmee het mogelijk is om continu s.c. desferrioxamine toe te dienen hetgeen heel effectief is en veel minder pijnlijk en belastend voor de patiënt.

May en Williams⁶⁸ hebben voorwaarden opgesteld waaraan een "ideale" ijzerchelator moet voldoen:

- 1- de chelator dient een grote specificiteit te bezitten voor Fe^{3+} terwijl andere kationen zoals Zn^{2+} en Ca^{2+} niet gebonden worden.
- 2- de chelator dient ijzer sterk te binden om competitie met andere biologische ijzerbindende liganden te kunnen weerstaan.
- 3- de ijzerchelator dient voldoende lipofiel te zijn om de celmembraan te passeren waardoor de ijzeropslagdepots kunnen worden bereikt.
- 4- het ijzer-chelatorcomplex dient lipofiel te zijn om te vermijden dat het complex zich in het hydrofiele cytosol ophoopt.
- 5- in het plasma moet het ijzer-chelatorcomplex hydrofiel zijn om heropname in andere weefsels te voorkomen en excretie via de nieren mogelijk te maken.
- 6- de ijzerchelator en het complex dienen niet toxisch te zijn bij lange-termijntoepassing.

Naast deze voorwaarden is het van belang dat de chelator werkzaam is na orale toediening en dat de chelator goedkoop is. Dit laatste is voornamelijk van belang omdat thalassemie vooral in die landen voorkomt waar men de enorme bedragen die met de behandeling met desferrioxamine gemoeid zijn (f 30.000,-/jaar) niet kan opbrengen. Juist deze twee laatste eigenschappen bezit desferrioxamine niet wat ertoe heeft geleid dat men nog steeds op zoek is naar een goedkope, oraal toe te dienen ijzerchelator die even effectief is als desferrioxamine^{69,70,71}. In tabel V zijn een aantal ijzerchelatoren vermeld die na klinische evaluatie zijn afgevallen als gevolg van ineffectiviteit of toxiciteit.

Op het ogenblik is de hoop gevestigd op een groep ijzerchelatoren (3-hydroxy-4-pyridon-, 3-hydroxy-4-pyronderivaten) die goedkoop

en oraal werkzaam zijn^{72,73,74,75}. Een aantal verbindingen is reeds uitgetest bij proefdieren en één ervan blijkt oraal even effectief als desferrioxamine i.p. Het wachten is nu op de resultaten uit de klinische testfase waarbij deze ijzerchelatoren zijn toegediend aan thalassemiepatiënten.

Tabel V

Overzicht van ijzerchelatoren die na de klinische testfase niet geschikt bleken om toegediend te worden aan patiënten met ijzerstapelingsziekten⁷⁶.

chelator	24 uurs Fe excretie (mg)	reden van afwijzing
EDTA	2 - 8.5	ineffectiviteit, renale toxiciteit
Versenol	3.6 - 10.5	ineffectiviteit
DHEG	2	ineffectiviteit
BAL	2	ineffectiviteit
CHA	< 10	ineffectiviteit
DTPA	20 - 250	algehele toxiciteit
EDDHA	18 - 25	levertoxiciteit, renale toxiciteit
5-HP	8.5 - 24.6	algehele toxiciteit
2,3-DHB	4.5 - 6.5	ineffectiviteit
Rhodotuluurzuur	40 - 80	alleen i.v.-toediening, i.m. te pijnlijk

1.6. Probleemstelling

Er is veel bekend over de opname van ijzer in verschillende celtypen terwijl er slechts weinig bekend is over de wijze waarop ijzer wordt gemobiliseerd uit de ijzeropslagdepots. Het kan belangrijk zijn om te weten welk mechanisme ten grondslag ligt aan het proces van ijzermobilisatie in verband met de behandeling van ijzerstapelingsziekten (o.a. β -thalassemie).

Een deel van de in dit proefschrift beschreven onderzoek is gewijd aan de bestudering van het effect van fysiologische en niet-fysiologische verbindingen op de ijzerafgifte uit radioactief gemerkte rattehepatocyten. Vervolgens is van een aantal ijzerchelatoren, die op dat moment sterk in de belangstelling stonden vanwege de mogelijke orale effectiviteit, onderzocht in welke mate deze ijzerchelatoren ijzer aan ferritine konden onttrekken en of de ijzer-chelatorcomplexen geen lipide-peroxidatie veroorzaakten. Als laatste aspect van de ijzermobilisatie is bij normale en ijzeroverladen ratten onderzocht uit welke celtypen (van lever en milt) ijzer werd gemobiliseerd wanneer door middel van herhaalde flebotomie ijzer werd onttrokken en op welke wijze ijzer uit ferritine werd gemobiliseerd.

Literatuur

- 1 Williams, J. The evolution of transferrin. Trends Biochem. Sci 7, 1982, 394-397.
- 2 Aisen, P., Leibman, A., Zweier, J.L. Stoichiometric and site characteristics of the binding of iron to human transferrin. J. Biol. Chem. 253, 1978, 1930-1937.
- 3 Cannon, J.C., Chasteen, N.D. Nonequivalence of the metal binding sites in vanadyl-labeled human serum transferrin. Biochemistry 14, 1975, 4573-4577.
- 4 Zweier, J.L. and Aisen, P. Studies of transferrin with the use of Cu^{2+} as an electron paramagnetic resonance spectroscopic probe. J. Biol. Chem. 252, 1977, 6090-6096.
- 5 Fletcher, J. and Huehns, E.R. Significance of the binding of iron by transferrin. Nature 215, 1967, 584-586.
- 6 Fletcher, J., Huehns, E.R. Function of transferrin. Nature 218, 1968, 1211-1214.
- 7 van der Heul, C., Kroos, M.J., Van Noort, W.L. and van Eijk, H.G. No functional difference of the two iron-binding sites of human transferrin in vitro. Clinical Science 60, 1981, 185-190.
- 8 van der Heul, C., Kroos, M.J., van Noort, W.L. and van Eijk, H.G. No functional difference between the two iron-binding sites of transferrin for hepatocytes and erythroid cells in vitro. in Proteins of Iron Storage and Transport
- 9 van der Heul, C., Kroos, M.J., van Noort, W.L., van Eijk, H.G. In vitro and in vivo studies of iron delivery by human monoferric transferrins. Brit. J. Haemat. 56, 571-580, 1984.
- 10 Jamieson, G.A. Studies on glycoproteins II. Isolation of the carbohydrate chains of human transferrin. J. Biol. Chem. 240, 2914-2920, 1965.
- 11 Jamieson, G.A., Jett, M., de Bernardo, S.L. The carbohydrate sequence of the glycopeptide chain of human transferrin. J. Biol. Chem. 246, 3686-3693, 1971.
- 12 Spik, G., Bayard, B., Fournet, B., Strecker, G., Bouquelet, S., Montreuil, J. Studies on glycoconjugates LXIV. Complete structure of two carbohydrate units of human serotransferrin. FEBS Lett. 50, 296-299, 1975.
- 13 Wong, K.-L., Debanne, M.T., Hatton, M.W.C., Regoeczi, E. Human transferrin, asialotransferrin and the intermediate forms. Int. J. Prot. Res. 12, 27-37, 1978.
- 14 Dekker, C.J. Academisch Proefschrift Erasmus Universiteit Rotterdam, 1987.
- 15 Banyard, S.H., Stammers, D.K., Harrison, P.M. Electron density map of apoferritin at 2.8 Å resolution. Nature 271, 1978, 282-284.
- 16 Crichton, R.R. Ferritin: structure, synthesis and function. N. Engl. J. Med. 284, 1413-1422, 1971.

- 17 Hoare, R.J., Harrison, P.M., Hoy, T.G. The molecular structure and metal-ion binding sites of horse spleen apoferritin. In: *Proteins of iron storage and transport in biochemistry and medicine*. Ed. R.R. Crichton. North-Holland, Amsterdam, pp. 231-236, 1975.
- 18 Hoare, R.J., Harrison, P.M., Hoy, T.G. Structure of horse spleen apoferritin at 6 Å resolution. *Nature* 255, 653-654, 1975.
- 19 Makino, Y., Konno, K. A comparison of ferritin from normal and tumor-bearing animals. *J. Biochem.* 65, 471-473, 1969.
- 20 Linder-Horowitz, M., Ruettinger, R.T., Munro, H.N. Iron induction of electrophoretically different ferritins in rat liver, heart and kidney. *Biochem. Biophys. Acta* 200, 442-448, 1970.
- 21 Drysdale, J.W., Microheterogeneity in ferritin molecules. *Biochim. Biophys. Acta* 207, 256-258, 1970.
- 22 Arosio, P., Adelman, T.G., Drysdale, J.W. On ferritin heterogeneity. Further evidence for heteropolymers. *J. Biol. Chem.* 253, 4451-4458, 1978.
- 23 Drysdale, J.W. *Ciba Found. Symp.* 51, 41-67, 1977.
- 24 Mazur, A. Green, S., Saha, A., Carleton, A. Mechanism of release of ferritin iron in vivo by xanthine oxidase. *J. Clin. Invest.* 37, 1809-1817, 1958.
- 25 Fridovich, I., Handler, P. Xanthine oxidase II. Studies of the active site. *Journal of Biological Chemistry* 231, 899, 1958.
- 26 Grace, N.D., Greenwald, M.A., Greenberg, M.S. Effect of allopurinol on iron mobilization. *Gastroenterology* 59, 103-108, 1970.
- 27 Kozma, C., Salvador, R.A., Elion, G.B. Allopurinol and iron storage. *Lancet* 2, 1040-1041, 1973.
- 28 Roeser, H.P., Lee, G.R., Nacht, S., Cartwright, G.E. The role of ceruloplasmin in iron metabolism. *J. Clin. Invest.* 49, 2408-2417, 1972.
- 29 Osaki, S., Johnson, D.A., Frieden, E. The mobilization of iron from the perfused mammalian liver by a serum copper enzyme, ferroxidase I. *J. Biol. Chem.* 246, 3018-3023, 1971.
- 30 Williams, D.M., Lee, G.R., Cartwright, G.E. Ferroxidase activity of rat ceruloplasmin. *Am. J. Physiol.* 227, 1094-1097, 1974.
- 31 Aisen, P. Brown, E.B. *Sem. Hemat.* 14, 31-53, 1977.
- 32 Osaki, S. Sirivech, S. *Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.* 30, abs. 1292, 1971.
- 33 Sirivech, S., Frieden, E., Osaki, S. The release of iron from horse spleen ferritin by reduced flavins. *Biochem. J.* 143, 311-315, 1974.

- 34 Baker, E., Morton, A.G., Tavill, A.S. In: Proteins of iron storage and transport in biochemistry and medicine I, editors A. Jacobs, M. Worwood, Academic Press, London and New-York, 1974, pp. 173-180.
- 35 Baker, E., Morton, A.G., Tavill, A.S. The regulation of iron release from the perfused rat liver. *Br. J. Haemat.* 45, 1980, 607-620.
- 36 Baker, E., Vicary, F.R., Huehns, E.R. Iron release from isolated hepatocytes. *Br. J. Haemat.* 47, 1981, 493-504.
- 37 Baker, E., Morgan, E.H. Transferrin and iron release from rat hepatocytes in culture. *Am. J. Physiol.* 248, 1985, G93-G97.
- 38 Rama, R., Octave, J.N., Schneider, Y.J., Sibille, J.C., Limet, J.N., Mareschal, J.C., Trouet, A., Crichton, R.R. Iron mobilization from cultured rat fibroblasts and hepatocytes. *FEBS Lett.* 127, 204-206, 1981.
- 39 Aisen, P. Transferrin and transferrin iron. In: Iron in Biochemistry and Medicine II, eds. A. Jacobs and M. Worwood. pp 87-129, Academic Press London, 1981.
- 40 Ley, T.J., Nienhuis, A.W. Transfusion hemosiderosis and chelation therapy. In: Disorders of Iron Metabolism. Clinics in Haematology 11:2, ed. A. Jacobs, pp. 437-454, W.B. Saunders, Eastbourne, 1982.
- 41 Piomelli, S., Seaman, C., Reibman, J., Tytun, A., Graziano, A., Tabachnik, N., Corash, L. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 75, 1978, 3474-3478.
- 42 Buja, L.M., Roberts, W.C. Iron in the heart. Etiology and clinical significance. *Am. J. Med.* 51, 209-221, 1971.
- 43 Nienhuis, A.W., Griffith P., Straweysky, H., Henry, W., Borer, J., Leon, M., Anderson, W.F. Evaluation of cardiac function in patients with thalassemia major. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 344, 387-396, 1980.
- 44 In : Harrison's Principles of internal medicine. Editors E. Braunwald, K.J. Isselbacher, R.G. Petersdorf, J.D. Wilson, J.B. Martin, A.S. Fauci. MacGraw-Hill Book Company, 1987, 11th ed., pp 1632-1635.
- 45 In : Harrison's Principles of internal medicine. Editors E. Braunwald, K.J. Isselbacher, R.G. Petersdorf, J.D. Wilson, J.B. Martin, A.S. Fauci. MacGraw-Hill Book Company, 1987, 11th ed., pp 1525-1527.
- 46 Peters, T.J., Semour, C.A. Acid hydrolase activities and lysosomal integrity in liver biopsies from patients with iron overload. *Clin. Sci. Mol. Med.* 50, 75, 1976.
- 47 Arborgh, B.A.M., Glaumann, H., Ericsson, J.L.E. Studies on iron loading of rat liver lysosomes. *Lab. Invest.* 30, 664, 1974.
- 48 Hultcrantz, R., Högberg, J., Glaumann, H. Studies on the rat liver following iron overload. *Virchows Arch.* 43, 67-74, 1983.

- 49 Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219, 1-14, 1984.
- 50 Gutteridge, J.M.C., Quinlan, G.J., Wilkins, S. Mitomycin C-induced deoxyribose degradation inhibited by superoxide dismutase. *FEBS Lett.* 167, 37-41, 1984.
- 51 Biemond, P., van Eijk, H.G., Swaak, A.J.G., Koster, J.F. Iron mobilization from ferritin by superoxide derived from stimulated polymorphonuclear leucocytes. Possible mechanism in inflammation diseases. *J. Clin. Invest.* 73, 1576-1579, 1984.
- 52 Fridovich, I. The biology of oxygen radicals. *Science* 201, 875-880, 1978.
- 53 Lai, C.S., Piette, L.H. Studies of hydroxyl radical pro-duction involved in lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 190, 27-38, 1978.
- 54 Heys, A.D., Dormandy, T.L. Lipid peroxidation in iron-overloaded spleens. *Clin. Sci. (Lond.)* 60, 295-301, 1981.
- 55 Gutteridge, J.M.C., Richmond, R., Halliwell, B. Inhibition of the iron-catalysed formation of hydroxyl radicals from superoxide and of lipid peroxidation by desferrioxamine. *Biochem. J.* 184, 469-472, 1979.
- 56 Hill, H.A.O., Okolow-Zubkowska, M.J. Oxygen and Life, pp 98-106, Royal Society of Chemistry Special Publications, London, 1981.
- 57 Suemastu, T., Kamada, T., Abe, H., Kikuchi, S., Yagi, K. Serum lipoperoxide level in patients suffering from liver disease. *Clin. Chim. Acta*, 79, 267-270, 1977.
- 58 Valdimirov, Yu-A, Olenov, V.I., Suslova, T.B., Cheremisina, Z.P. Lipid peroxidation in the mitochondrial membrane. *Adv. Lipid. Res.* 17, 174-249, 1980.
- 59 Sephton-Smith, R. Iron excretion in thalassemia major after administration of chelating agents. *Brit. Med. J.* ii, 1577-1582, 1962.
- 60 Keberle, H. The biochemistry of desferrioxamine and its relation to iron metabolism. *Ann. NY Acad. Sci.* 41, 758, 1964.
- 61 Cumming, R.L.C., Millar, J.A., Smith, J.A. Clinical Laboratory studies on the action of desferrioxamine. *Br. J. Haemat.* 17, 257-263, 1969.
- 62 Barry, M., Flynn, D.N., Letsky, E.A., Risdon, R.A. Long term chelation therapy in thalassaemia major: effect on liver iron concentration, liver histology and clinical progress. *Brit. Med. J.* i, 16-20, 1974.
- 63 Modell, B., Beck, J., Long-term desferrioxamine therapy in thalassemia major. *Ann. NY Acad. Sci.* 232, 201-213, 1974.
- 64 Graziano, J.H., Markenson, A., Miller, D.R. Chang, H. Bestak, M., Meyers, P., Pisciotto, P., Rifkind, A. Chelation therapy in β -thalassemia major. I. Intravenous and subcutaneous desferrioxamine. *J. Pediatrics* 92, 648-652, 1978.

- 65 O'Brien, R.T. Ascorbic acid enhancement of desferrioxamine-induced urinary iron excretion. *Ann. NY Acad. Sci.* 232, 221-225, 1974.
- 66 Nienhuis, A.W., Delea, C., Aamodt, R. Evaluation of desferri-oxamine and ascorbic acid for the treatment of chronic iron overload. *Birth Defects* 12, 177-185, 1976.
- 67 Propper, R.D., Cooper, B., Rufo, R.R., Nienhuis, A.W., Anderson, W.F., Bunn, W.F., Rosenthal, A., Nathan, D.G. Continuous subcutaneous administration of desferrioxamine in patients with iron overload. *New Eng. J. Med.* 297, 418, 1977.
- 68 May, P.M., Williams, D.R. In: *Iron in biochemistry and medicine II*, eds. A. Jacobs and M. Worwood, Academic Press, New York, London, pp. 1-26, 1980.
- 69 Pitt, C.G., Gupta, G., Estes, W.E., Rosenkrantz, H., Metterville, J.J. et al. The selection and evaluation of new chelating agents for the treatment of iron overload. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 208, 12-29, 1979.
- 70 Martell, A.E., Andersson, W.F., Badman, D.G. Development of iron chelators for clinical use. Elsevier/North Holland, New York, 1981.
- 71 Cerami, A., Grady, R.W., Peterson, C.M., Barghava, K.K. The status of new iron chelators. *Ann. NY Acad. Sci.* 344, 425-432, 1980.
- 72 Kontoghiorghes, G.J. New orally active iron chelators. *Lancet* ii, 817, 1985.
- 73 Kontoghiorghes, G.J., Hoffbrand, A.V. Orally active α -ketohydroxy pyridine iron chelators intended for clinical use: in vivo studies in rabbits. *Br. J. Haem.* 62, 607-613, 1986.
- 74 Kontoghiorghes, G.J. Iron mobilization from ferritin using α -oxohydroxy heteroaromatic chelators. *Biochem. J.* 233, 299-302, 1986.
- 75 Kontoghiorghes, G.J., Chambers, S., Hoffbrand, A.V. Comparative study of iron mobilization from haemosiderin, ferritin and Fe(III)precipitates by chelators. *Biochem. J.* 241, 87-92, 1987.
- 76 Brown, E.B. *Thalassemia*. In: *Orphan drugs and Orphan diseases: Clinical realities and public policy*, Alan R. Liss, Inc, New York, 1983, pp 33-42.

Hoofdstuk 2

Hoofdstuk 2.

2.1. Materiaal en Methoden.

In dit hoofdstuk wordt een overzicht gegeven van de materialen en methoden die veel gebruikt worden in het in dit proefschrift beschreven onderzoek. In de volgende hoofdstukken wordt voor deze algemene methoden naar dit hoofdstuk verwezen. De meer specifieke methoden die niet zo frequent worden gebruikt zijn in de betreffende hoofdstukken beschreven.

2.2. Chemicaliën

Alle gebruikte chemicaliën waren van pro-analyse kwaliteit.

2.3. Isotopen

$^{59}\text{FeCl}_3$ (1 mCi/ml) en ^{59}Fe -citraat (100 $\mu\text{Ci/ml}$) werden verkregen van Radio-chemical Centre, Amersham, U.K.

2.4. Radioactief merken van rattehepatocyten

Een dag voordat een enzymperfusie werd uitgevoerd, werd een rat (300 gram) intraveneus geïnjecteerd met een oplossing die bestaat uit 100 μl fysiologisch zout waaraan is toegevoegd 1 mg ratte-transferrine, 60 μl $^{59}\text{FeCl}_3$, 50 μl NaHCO_3 1 M en 440 μl 0.1 M fosfaatbuffer pH 7.4.

2.5. Enzymperfusie van de rattelever met collagenase

Alle perfusiebuffers werden geëquilibreerd met 95% O_2 / 5% CO_2 . Ratten werden onder verdoving gebracht door middel van een intraperitoneale injectie van 0.7 ml pentobarbital (50 mg/ml). Vervolgens werd de vena portae gecanuleerd en buffer, bestaande uit 10 mM HEPES (Merck, Darmstadt, West-Duitsland), 140 mM NaCl en 7 mM KCl met een pH 7.4, door de lever gepompt met een snelheid van 12 ml/min. De vena cava inferior werd juist boven de vena renalis afgebonden en juist onder de vena renalis doorgesneden. De borstkas werd geopend en de vena cava superior gecanuleerd.

Hierna werd de perfusiesnelheid verhoogd tot 48 ml/min. Na passage van 250 ml van de eerste buffer werd geperfundeerd met 500 ml van een buffer die bestond uit 100 mM HEPES, 66 mM NaCl, 7 mM KCl, 3.6 mM CaCl_2 , 0.25% BSA (Sigma, St. Louis, USA) en 200 mg collagenase, pH 7.4. De collagenase werd vervolgens uitgewassen met 150 ml van een spoelbuffer die bestond uit 50 mM HEPES, 110 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.74 mM MgCl_2 , 1.26 mM CaCl_2 en 0.25% BSA pH 7.4. De lever werd in een bekerglas met een kleine hoeveelheid van de laatst gebruikte buffer overgebracht. Hierna werden de cellen vrijgemaakt door de lever voorzichtig in te knippen met een schaar. Vervolgens werd door twee lagen gaasdoek (Nybolt, Zwitserland) gefiltreerd. Hierna werd gedurende 30 seconden bij 50 g gecentrifugeerd en de hepatocyten drie maal gewassen met dezelfde buffer om de niet-parenchymale cellen te verwijderen. De levensvatbaarheid werd in eerste instantie gecontroleerd met Trypan Blue, alleen hepatocyten met een levensvatbaarheid groter dan 90% werden gebruikt voor de experimenten.

2.6. Ruwe schatting van de levensvatbaarheid van de geïsoleerde hepatocyten

Om snel een indruk te krijgen van de levensvatbaarheid van de geïsoleerde hepatocyten, werd een kleuring met Trypan Blue gebruikt. Levende hepatocyten kunnen deze kleurstof buiten de cel houden terwijl het cytoplasma bij dode hepatocyten blauw kleurt. Door de gekleurde celsuspensie onder de lichtmicroscop (10x10) te bekijken is een ruwe schatting te maken van het percentage levende hepatocyten in de suspensie. Omdat deze bepaling weinig tijd kost en eenvoudig is uit te voeren is deze bepaling gebruikt om snel na te gaan of het percentage levende hepatocyten groot genoeg was (>90%) om verder te gebruiken in een incubatieexperiment.

Reagentia.

- Trypan Blue-oplossing.

150 mg Trypan Blue (BDH, Poole, U.K.) wordt samen met 120 mg NaCl opgelost in 25 ml P.B.S. en op pH 7.4 gesteld. Deze oplossing moet vervolgens enkele malen gefiltreerd worden over een papierfilter en is dan klaar voor gebruik.

Uitvoering.

100 μ l van de Trypan Blue-oplossing werd in een Eppendorffcupje voorzichtig toegevoegd aan 100 μ l hepatocytsuspensie. 50 μ l werd op een objectglaasje gebracht en afgedekt met een dekglasje en onmiddellijk onder de microscoop bekeken. Er worden een aantal gezichtsvelden globaal geteld waaruit het aantal levende hepatocyten werd berekend.

2.7. Controle van de levensvatbaarheid van de geïsoleerde hepatocyten met een LDH- meting

Wanneer hepatocyten ten gronde gaan zal de celinhoud in het incubatiemedium terecht komen. Als markerenzym voor het cytosol werd lactaat dehydrogenase gebruikt. Lactaatdehydrogenase katalyseert de onderstaande reactie:



De activiteit van het enzym werd spectrofotometrisch bepaald bij 340 nm door de extinctie-afname in de tijd te meten. De volume activiteit kan met onderstaande formule worden berekend.

$$\text{volume-activiteit (U/ml)} = (V_t/V_m) * (\Delta E/\text{min.}/\epsilon * l) * f$$

U/ml = aantal units per ml monster

V_t , V_m = totaal-, resp. monster volume

$\Delta E/\text{min.}$ = extinctieafname per minuut

ϵ = molaire extinctiecoëfficiënt van NADH (6.30 l/mol.cm)

- l = weglengte cuvet
f = verdunningsfactor

Reagentia.

- fosfaatbuffer 0.05 M pH 7.5
- substraatbuffer pH 7.5
- 5.1 mg natriumpyruvaat (Boehringer, Mannheim, West-Duitsland)
in 50 ml fosfaatbuffer
- NADH-oplossing
- 19.8 mg NADH (Boehringer, Mannheim, West-Duitsland) in 50 ml
aqua bidest.

Uitvoering.

1 ml celsuspensie werd gedurende 10 minuten gecentrifugeerd bij 1700 g, waarna de pellet en supernatant gescheiden werden. De pellet werd gelyseerd door toevoeging van 2 ml aqua bidest. In de monstercuvet werd achtereenvolgens 2 ml substraatbuffer en 1 ml NADH-oplossing gepipetteerd. Vervolgens werd 0.1 ml monster toegevoegd en goed gemengd. De monstercuvet werd in de lichtweg gebracht en de extinctieafname gedurende 3 minuten gevolgd. Met behulp van een recorder werd de extinctieafname grafisch gevolgd. De gelyseerde celpellet en het supernatant werden zodanig verdund dat de extinctieafname ongeveer 0.040/min. bedroeg.

2.8. Isolatie van ratteleverferritine

Uit ongeveer 50 rattelevers (500 gram) werd leverferritine geïsoleerd volgens de methode van Penders et al¹.

Reagentia.

- LiOH-boraatbuffer 0.05 M, pH 8.6
- 5.25 gram borax en 5.58 gram boorzuur (Merck, Darmstadt, West-Duitsland) wordt opgelost in 1 liter aqua bidest. en de pH met behulp van 1 M LiOH (Merck, Darmstadt, West-Duitsland) gesteld op 8.6.

Uitvoering.

De rattelevers werden in 3 maal hun gewicht aan fysiologisch zout met een Ultraturrax mixer gehomogeniseerd. Vervolgens werd het homogenaat in een glazen bekerglas gedurende 10 minuten verhit bij 80°C. Hierna werd 45 minuten bij 3000 g gecentrifugeerd. Het ferritine-bevattende supernatant werd vervolgens in een ultracentrifuge (Beckman L8-70, rotor TI 70) gecentrifugeerd gedurende 60 minuten bij 78.000 g. Het donkerrood-bruine precipitaat werd opgenomen in een kleine hoeveelheid fysiologisch zout en gecentrifugeerd bij 7000 g gedurende 60 minuten. Vervolgens werd het supernatant afgepipetteerd en gedurende 1 uur gecentrifugeerd bij 95.000 g. Na centrifugeren werd het supernatant verwijderd en de pellet opgelost in een kleine hoeveelheid fysiologisch zout. Na nog één keer centrifugeren gedurende één uur bij 98.000 g werd na verwijderen van het supernatant, de ferritine bevattende pellet opgelost in zo min mogelijk fysiologisch zout en voor verdere zuivering gebracht op een Sepharose 4B-kolom (100x4 cm) en geëluëerd met een LiOH-boraatbuffer (0.05 M, pH 8.6). Na elutie werden de ferritinebevattende fracties verzameld en geconcentreerd d.m.v. vacuümdialyse.

2.9. Isolatie van rattemiltferritine.

Uit ongeveer 100 rattemiltjes (40 gram) werd volgens de methode van Penders¹, beschreven onder 2.8, rattemiltferritine geïsoleerd.

2.10. Eiwitbepaling volgens Markwell

Het eiwitgehalte werd bij voorkeur bepaald met de methode volgens Markwell². In enkele gevallen, bij voorbeeld in aanwezigheid van een aantal in hoofdstuk 4 beschreven ijzerchelatoren, bleek het niet mogelijk om met deze methode de eiwitconcentratie te meten en werd gebruik gemaakt van de methode volgens Bradford³ die onder 2.11 is beschreven.

Reagentia.

- standaardreeks eiwit.

BSA 100-1000 $\mu\text{g/ml}$

- reagens A.

20.0 gram natriumcarbonaat, 4.0 gram natriumhydroxide, 1.6 gram kaliumnatriumtartraat en 10.0 gram SDS (BDH, Poole, U.K.) worden opgelost in 1 liter aqua bidest.

- reagens B.

0.4 gram kopersulfaat wordt opgelost in 10 ml aqua bidest.

- werkreagens.

Meng 100 volumedelen reagens A met 1 volumedeel reagens B.

- verdunde fenolreagens.

Folin-Ciocalteu fenolreagens wordt kort voor gebruik 1:1 verdund met aqua bidest.

Uitvoering.

Er werden eiwitstandaarden gemaakt die 100-1000 μg BSA/ml bevatten. Aan 0.1 ml monster dat 10-100 μg eiwit bevat werd 0.9 ml aqua bidest toegevoegd en 3 ml werkreagens waarna 10-60 min. werd geïncubeerd bij kamertemperatuur. Vervolgens werd 0.3 ml verdund fenolreagens toegevoegd en 45 minuten geïncubeerd bij kamertemperatuur. De extinctie van de monsters werd bij 660 nm bepaald en de concentratie met behulp van de ijklijn berekend.

2.11. Eiwitbepaling volgens Bradford

Er werd een serie standaarden gemaakt die 20-200 μg BSA/ml bevat. Aan 0.1 ml monster werd 1 ml kleurreagens toegevoegd en na 2 min. de extinctie bij 595 nm afgelezen. Met behulp van de ijklijn werd het eiwitgehalte van de monsters bepaald.

Reagentia.

- eiwitstandaarden

20-200 μg BSA/ml

- kleurreagens.

100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 wordt opgelost in 50 ml 95% ethanol. Vervolgens wordt 100 ml fosforzuur 85% toegevoegd en met aqua bidest. aangevuld tot 1 liter.

2.12. Opladen van apo-ferritine met een mengsel van ^{59}Fe en ^{56}Fe

Paardemilt apo-ferritine werd volgens een voorschrift van Hoy et al.⁴ opgeladen met ijzer.

Reagentia.

- apo-ferritine 50 mg/ml (Sigma, St. Louis, USA)
- ferroammoniumsulfaat, $(\text{NH}_4)_2\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{aq}$
- kaliumjodaat, KIO_3
- natriumthiosulfaat, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{aq}$
- ammoniumsulfaat, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- $^{59}\text{Fe}(\text{III})$ chloride, $^{59}\text{FeCl}_3$ 1mCi/ml

Uitvoering.

De hoeveelheid ijzer die nodig is om 5 mg apo-ferritine op te laden met ferroammoniumsulfaat tot 2200 Fe atomen per ferritine-molecuul werd berekend. De hoeveelheid ijzer die toegevoegd werd door het $^{59}\text{Fe}(\text{III})$ chloride was te verwaarlozen. Kaliumjodaat, ferroammoniumsulfaat en natriumthiosulfaat werden afgewogen in de volgende gewichtsverhouding $\text{KIO}_3 : (\text{NH}_4)_2\text{FeSO}_4 : \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 = 1:2:4$. Het ferroammoniumsulfaat werd samen met het natriumthiosulfaat en 40 μl $^{59}\text{Fe}(\text{III})$ -chloride opgelost in 860 μl aqua bidest, waarna 100 μl apo-ferritine (5 mg) werd toegevoegd. Direct hierna werd het kaliumjodaat, opgelost in 1 ml aqua bidest, toegevoegd. De kleurloze oplossing kleurde geleidelijk oranje en de uiteindelijke kleur van de oplossing was donkeroranje. De oplossing werd overnacht gedialyseerd tegen 1% ammoniumsulfaatoplossing bij 4°C gevolgd door dialyse tegen fysiologisch zout. De uiteindelijke ferritine-oplossing werd aangevuld tot 4 ml en bewaard bij 4°C.

Literatuur

- 1 Penders, T.J., De Rooij-Dijk, H.H., Leijnse, B. Rapid isolation of ferritin by means of ultracentrifugation. *Biochim. Biophys. Acta* 168, 1968, 588-590.
- 2 Markwell, M.A.K., Haas, S.M., Bieber, L.L., Tolbert, N.E. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analyt. Biochem.* 87, 1978, 206-210.
- 3 Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 1976, 248-251.
- 4 Hoy, T.G., Harrison, P.M., Shabbir, M. Uptake and release of ferritin iron. *Biochem. J.* 139, 1974, 603-607.

Hoofdstuk 3

Hoofdstuk 3.

3.1. IJzermobilisatie uit geïsoleerde hepatocyten^b

Ferritine is het belangrijkste eiwit voor ijzeropslag in de meeste cellen. Tijdens een anemie wordt ijzer gemobiliseerd uit ferritine zodat dit gebruikt kan worden voor inbouw in hemoglobine. Artikelen over ijzermobilisatie uit hepatocyten zijn schaars en het is nog steeds onbekend op welk signaal en via welk mechanisme de cel ijzer gaat mobiliseren. In vitro zijn een reeks van snelheden voor ijzerafgifte gevonden. De meeste studies zijn gedaan naar de ijzerafgifte uit ferritine in celvrije systemen.

Crichton et al.¹ en Funk et al.² hebben aangetoond dat een reductieve stap de ijzerafgifte uit ferritine versnelt. Baker et al.^{3,4,5,6} die geperfundeerde levers en geïsoleerde hepatocyten gebruikten, vonden dat apo-transferrine, citraat en desferrioxamine effectief waren in de ijzermobilisatie.

Aangezien bekend is dat tijdens een anemie wél ijzer uit de lever wordt gemobiliseerd, is onderzocht of serum van anemisch gemaakte ratten in onze incubatieexperimenten de afgiftesnelheid van ijzer uit hepatocyten beïnvloedt. Daarnaast is onderzocht of apo-transferrine en verschillende ijzerchelatoren ook invloed hebben op de afgifte van ijzer uit hepatocyten.

3.2. Materiaal en methoden

3.2.1. De bereiding van anemisch ratteserum

Anemisch ratteserum (= serum van anemisch gemaakte ratten) werd verkregen door ratten gedurende een periode van 3 weken een maal per week 4-6 ml bloed via orbita punctie af te nemen. Na deze periode werd na bloedafname, het bloed gecentrifugeerd en het serum gebruikt voor de experimenten (Hb normale ratten 10.1 ± 0.4 mmol/l, anemische ratten 8.7 ± 0.3 mmol/l).

^b Gepubliceerd in International Journal of Biochemistry 18, 1061-1064, 1986.

3.2.2. Rattetransferrine

Rattetransferrine en apo-rattetransferrine werden verkregen als beschreven in hoofdstuk 2.

3.2.3. Anti-ratteleverferritine

Reagentia

- DEAE Trisacryl M (LKB, Zweden)

- Trisbuffer 0.25 M pH 8.8 (stock-oplossing)

Los 60.55 g Tris en 40.95 g NaCl op in aqua bidest en stel de pH op 8.8. Vul aan met bidest tot 2 liter. Verdun de stock-oplossing 10 maal met aqua bidest voor gebruik en stel de pH op 8.8.

- spoelbuffer pH 8.8 (stock-oplossing)

Los 9.08 g Tris en 175.5 g NaCl op in aqua bidest en breng de pH op 8.8 en vul vervolgens aan tot 1 liter. Verdun deze buffer 3 maal voor gebruik en stel de pH op 8.8.

- Trisbuffer 0.1 M pH 7.4

Los 12.1 gram Tris op in 1 liter aqua bidest en stel de pH op 7.4.

Anti-ratteleverferritine werd verkregen door een konijn te immuniseren met ratteleverferritine. Van het konijneserum werd een IgG-rijke fractie gemaakt volgens een voorschrift van Corthier⁷. Het IgG-bevattende konijneserum werd na filtratie opgebracht op een DEAE Trisacryl kolom en geëlueerd met 0.025 M Trisbuffer en het eluaat gefractioneerd opgevangen. Na elutie van de IgG-piek (fig. 1) werd overgeschakeld op spoelbuffer met een hogere ionsterkte die de aan de kolom gebonden eiwitten van de kolom spoelt. Hierna werd de kolom geregenereerd met 0.025 M Trisbuffer. De IgG-rijke fracties werden na een aantal isolaties samengevoegd en geconcentreerd met behulp van onderdrukfiltratie. De geconcentreerde antiratteferritineoplossing werd vervolgens gedialyseerd tegen 0.1 M Trisbuffer.

3.2.4. Koppeling van anti-ratteleverferritine aan Sepharose-CNBr

Reagentia

- Sepharose 4B CNBr-geactiveerd (Pharmacia, Zweden)
- wasbuffer pH 3.0

Voeg aan 1 liter aqua bidest een hoeveelheid HCl 1 M toe totdat de oplossing een pH van 3.0 heeft.

- koppelingsbuffer pH 8.5

Los 11.16 gram boorzuur (H_3BO_4), 29.44 gram NaCl en 21 gram natriumtetraboraat ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{aq}$) op in 2 liter aqua bidest en stel de pH op 8.5.

- blokkeerbuffer pH 8.5

Voeg aan een hoeveelheid van 6 ml ethanolamine 60 ml koppeling-sbuffer toe en stel de pH met geconcentreerd zoutzuur op 8.5 en vul aan met koppelingsbuffer tot 100 ml.

- anti-ratteleverferritine (ca. 100 mg/ml)

Een hoeveelheid van 10 gram Sepharose-CNBr werd afgewogen en gesuspendeerd in wasbuffer waarna zwelling van het Sepharose optrad (1 gram Sepharose heeft dan een volume van ongeveer 3.5 ml). Na het zwellen werd de gel enige malen gewassen en na afzuigen van de wasbuffer op een D3 filter werd de gel gesuspendeerd in koppelingsbuffer, 30-40 mg anti-ratteleverferritine (eiwit $\epsilon=1.3$ ml/mg.cm) werd toegevoegd aan de gel en onder rotatie gedurende twee uur rustig gemengd. Na centrifugeren van de gel bij 1700 g werd in het supernatant het eiwit gemeten en het percentage eiwit dat gekoppeld was gemeten (>90%). Vervolgens werd de suspensie op een D3-filter gebracht en de hoeveelheid niet-gekoppeld eiwit door wassen met blokkeerbuffer verwijderd. Tenslotte werd de gel opnieuw gewassen met koppelingsbuffer en uiteindelijk gesuspendeerd in een hoeveelheid koppelingsbuffer die op pH 7.4 was gebracht.

3.2.5. Radioactief gemerkte hepatocyten

^{59}Fe -gemerkte hepatocyten werden verkregen zoals is beschreven in hoofdstuk 2.

3.2.6. Incubatie experimenten

Voor alle incubatie-experimenten werden alleen celsuspensies gebruikt die een levensvatbaarheid hadden van meer dan 90%. De levensvatbaarheid van de hepatocyten werd bepaald volgens de methode beschreven in hoofdstuk 2. De incubatie-experimenten werden uitgevoerd bij 37°C gedurende 70-90 minuten in glazen erlenmeyers van 100 ml in een schudwaterbad. Het incubatiemedium (beschreven in hoofdstuk 2) bevatte $1-3 \times 10^7$ hepatocyten per ml. In alle incubatie-experimenten konden slechts vier chelatoren worden bestudeerd en hun effect werd vergeleken met dat van een blanco die alleen bestaat uit incubatiemedium zonder enige toevoeging. Gedurende het experiment werden iedere 10 minuten monsters van 1 ml uit de incubatievaatjes genomen. Vervolgens werden de monsters gecentrifugeerd bij 1700 g en de celpellet en het incubatiemedium gescheiden. Om te corrigeren voor lekkage van radioactief gemerkt cellulair ferritine in het incubatiemedium, werd het incubatiemedium na scheiding van de celpellet behandeld met aan Sepharose-bolletjes gekoppeld anti-ratteleverferritine. Gedurende een uur werd het incubatiemedium bij kamertemperatuur geïncubeerd met het anti-ratteleverferritine. Vervolgens werden alle monsters gecentrifugeerd bij 1700 g en de ferritine-bevattende pellet gescheiden van het supernatant (= oorspronkelijke incubatiemedium). Hierna werden alle monsters geteld in een gamma-counter (Packard 500C auto gamma spectrometer). Uit het aantal cpm in de pellet en het incubatiemedium werd het percentage ijzermobilisatie berekend. De snelheid van ijzermobilisatie werd berekend uit de helling van de mobilisatiecurve tussen $t=20$ en $t=80$ minuten.

3.2.7. Bereiding van het 100.000 g cytosol uit rattehepatocyten.

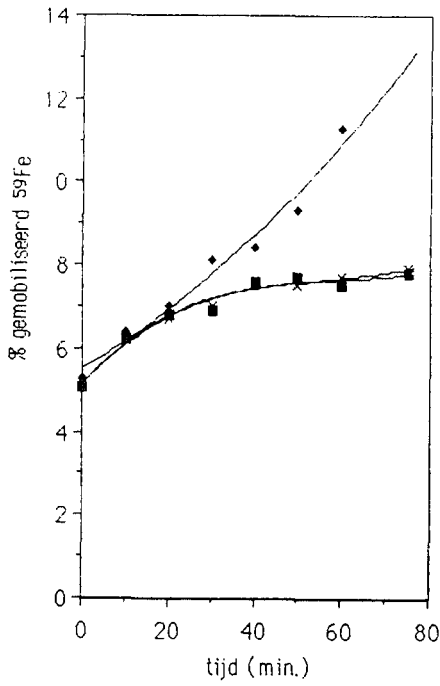
Het cytosol van de hepatocyten werd als volgt bereid. Een celpellet, verkregen uit ongeveer 10 ml cellen, werd gedurende 2 minuten gesonificeerd in aqua bidest. Het homogenaat werd vervolgens een uur gecentrifugeerd op 100.000 g in een Beckman L8-70 ultracentrifuge. Het supernatant werd vervolgens gescheiden van

de pellet waarna een deel van het supernatant werd gebracht op een Sephadex G-50 kolom (55x3 cm) en geëluëerd met een pompsnelheid van 33 ml/uur. De elutiebuffer bestond uit 0.1 M Tris en 0.5 M NaCl met een pH van 8.2. Na fractionering werden alle fracties geteld in een gammacounter. Het percentage radioactiviteit in elke fractie werd berekend door het aantal cpm in elke fractie te delen door de som van het aantal cpm in alle fracties.

3.3. Resultaten

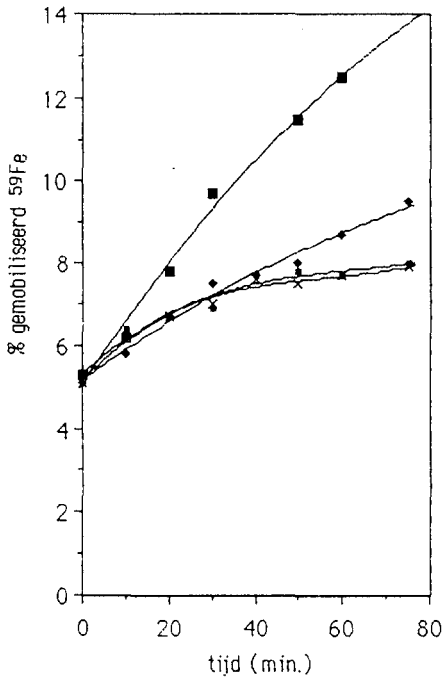
De ijzermobilisatie verkregen door incubaties van rattehepatocyten met anemisch en normaal ratteserum is weergegeven in figuur 1. Anemisch serum geeft een significant hogere ijzermobilisatie te zien dan normaal ratteserum.

Omdat apo-transferrine een fysiologische acceptor zou kunnen zijn voor ijzer dat afgegeven wordt door de lever, is het effect van apo-transferrine op de ijzermobilisatie uit geïsoleerde hepatocyten bestudeerd. In tegenstelling tot Baker et al.^{3,4,5,6} vonden wij geen verhoging van de ijzerafgifte uit hepatocyten na incubatie met apo-transferrine (figuur 2). Baker vond ook dat citraat de ijzermobilisatie verhoogde. In figuur 2 is te zien dat citraat, in dezelfde hoge concentratie die niet fysiologisch is, ook in onze experimenten ijzer kon mobiliseren. Als gevolg van de hoge citraatconcentratie is het mogelijk dat intracellulair reductie-equivalenten worden verhoogd via de citroenzuurcyclus. Op het ogenblik is het algemeen aanvaard dat een reductieve stap de ijzermobilisatie uit ferritine bevordert^{1,8,9,10,11}. Om deze situatie na te bootsen is 25 mM ethanol aan de hepatocyten-suspensie toegevoegd. Via de omzetting van ethanol tot acetaldehyde zou NAD⁺ omgezet worden in NADH wat reductie-equivalenten kan leveren nodig voor ijzermobilisatie uit ferritine. Echter toevoeging van ethanol bleek geen effect te hebben op de ijzerafgifte uit de hepatocyten. Het verschil tussen citraat en ethanol is dat citraat mitochondriaal en ethanol cytoplasmatisch reductie-equivalenten levert wat mogelijk een aanwijzing is dat



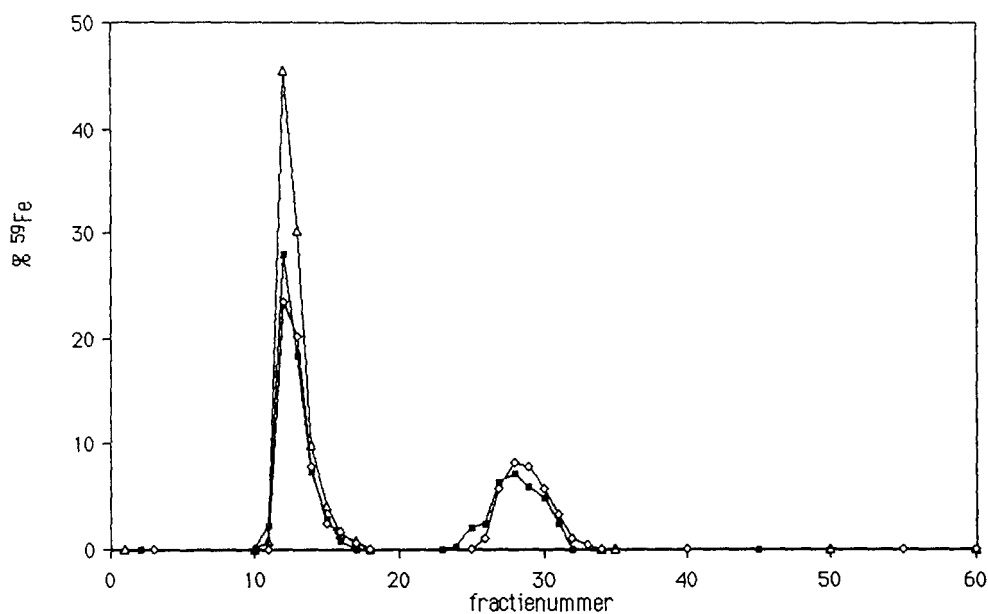
figuur 1.
IJzermobilisatie uit geïsoleerde
hepatocyten.

- × blanko
- ♦ anemisch ratteserum 50 % v/v
- normaal ratteserum 50% v/v



figuur 2.
IJzermobilisatie uit geïsoleerde
hepatocyten.

- × blanko
- ♦ desferrioxamine 1 mM
- Na-citraat 25 mM
- apo-rattetransferrine 3 mg/ml



Figuur 3.

Gelfiltratie van het 100.000 g hepatocytencytosol over Sephadex G-50.

- △— $t = 0$ min. - desferrioxamine 1 mM
- desferrioxamine 1 mM + ascorbinezuur 10 mM
- $t = 80$ min. - desferrioxamine 1 mM
- $t = 80$ min. - desferrioxamine 1 mM + ascorbinezuur 10 mM

ijzermobilisatie slechts kan plaatsvinden wanneer tevens reductie-equivalenten uit een bepaald compartiment aanwezig zijn.

Tot op heden is desferrioxamine de enige klinisch gebruikte ijzerchelator. Desferrioxamine wordt vaak gecombineerd met ascorbinezuur om een mogelijke verhoging van de ijzerexcretie te bewerkstelligen ^{12,13,14,15}. In onze experimenten met geïsoleerde rattehepatocyten die geïncubeerd werden met 1 mM desferrioxamine (fig. 3) werd slechts een lage ijzermobilisatiesnelheid waargenomen (1.5 %/hr, zie Tabel I voor vergelijking). ^{16,17 18}

Het 100.000 g cytosol dat verkregen werd op verschillende tijden gedurende de incubatie van rattehepatocyten met 1 mM desferrioxamine en 1 mM desferrioxamine samen met 10 mM ascorbinezuur, werd vervolgens gebracht op een Sephadex G-50 kolom en gefractioneerd (figuur 3). Op $t=0$ is te zien dat alle radioactiviteit (^{59}Fe) is ingebouwd in ferritine, dat elueerde in het dode volume van de kolom. Op $t=80$ minuten is er een aanzienlijke hoeveelheid radioactiviteit geëluëerd in een laag-moleculaire fractie terwijl de radioactiviteit die aanwezig was in de ferritinepiek verminderde. Als controle werd ook ^{59}Fe -ferrioxamine gefractioneerd over Sephadex G-50. Het bleek dat ^{59}Fe -ferrioxamine met hetzelfde elutievolume elueerde als de laagmoleculaire ijzerpiek van de incubatie-experimenten. Deze laagmoleculaire ijzerpiek bevat dus ijzer, uit ferritine afkomstig, dat niet aan de circulatie is afgegeven maar intracellulair aanwezig is.

3.4. Discussie

Het aantal publicaties over ijzermobilisatie uit hepatocyten is zeer gelimiteerd. De vermelde ijzermobilisatiesnelheden variëren aanzienlijk. In tabel I is een overzicht gegeven van een aantal mobilisatiesnelheden verkregen door incubatieexperimenten met verschillende verbindingen van zowel fysiologische als niet-fysiologische aard. De waarden die wij hebben gevonden voor ijzermobilisatie uit rattehepatocyten zijn in overeenstemming met de waarden die in de literatuur zijn vermeld met uitzondering

Tabel I.

Overzicht van in de literatuur vermelde ijzermobilisatie snelheden.

^a wil zeggen dat reticulocyten gebruikt zijn als testsysteem.

^b geeft aan dat ijzermobilisatie uit paardemilt ferritine is gemeten.

Wanneer verder niets is vermeld betekent dit dat hepatocyten als testsysteem zijn gebruikt.

Chelator	ijzermobilisatie snelheid	referentie
apo-transferrine (1.5 mg/ml)	0.56%/uur	Baker et al. ³
apo-transferrine (3 mg/ml)	3.7%/uur	Baker et al. ⁵
apo-transferrine (0.1 mg/ml)	7% in 1 uur	Octave et al. ¹⁶
apo-transferrine (0.1 mg/ml)	24% in 20 uur	Baker et al. ⁶
apo-transferrine (3 mg/ml)	geen ijzer- afgifte	Mostert et al.
citraat (25 mM)	40% in 30 min.	Baker et al. ⁵
citraat (5 mM)	1.9% in 1 uur ^a	Ponka et al. ¹⁷
citraat (1 mM)	20% in 20 uur	Baker et al. ⁶
citraat (2 mM)	42% in 20 uur	Baker et al. ⁶
citraat (10 mM)	57% in 20 uur	Baker et al. ⁶
citraat (25 mM)	4.6%/uur	Mostert et al.
desferrioxamine (2 mM)	1.8%/uur ^a	Ponka et al. ¹⁸
desferrioxamine (5 mM)	5.1%/uur ^a	Ponka et al. ¹⁸
desferrioxamine (1 mM)	10% in 24 uur ^b	Crichton et al. ⁹
desferrioxamine (0.64 mM)	3.9%/uur	Baker et al. ⁵
desferrioxamine (50 µM)	10% in 1 uur	Octave et al. ¹⁶
desferrioxamine (5 mM)	1.3% in 1 uur ^a	Ponka et al. ¹⁷
desferrioxamine (1 mM)	22% in 20 uur	Baker et al. ⁶
desferrioxamine (1 mM)	1.4%/uur	Mostert et al.

van die voor apo-transferrine.

Naar aanleiding van onze experimenten met anemisch ratteserum veronderstellen wij dat dit mogelijk een factor bevat die de hepatocyten aanzet om ijzer te mobiliseren en af te geven aan de circulatie. Door onze incubatieexperimenten wordt de mogelijkheid uitgesloten dat apo-transferrine hierbij is betrokken. Dit is in strijd met de waarnemingen van Baker et al.^{3,4,5,6} die juist wél vonden dat apo-transferrine in staat was om ijzer te mobiliseren.

Echter in overeenstemming met de resultaten van Baker et al. vonden wij ook een ijzermobilisatie uit geïsoleerde hepatocyten met citraat (4.6%/uur). Deze mobilisatie wordt mogelijk veroorzaakt door een verschuiving naar een meer gereduceerde staat. Wanneer men de resultaten van Sirivech et al.⁸, Crichton et al.¹, Jones et al.¹⁰, Rowley et al.¹¹ en Funk et al.² beschouwt, waar gesteld wordt dat voor ijzermobilisatie uit ferritine een reductieve stap noodzakelijk is, lijkt het mogelijk dat bij een dergelijke hoge citraatconcentratie als in onze incubatieexperimenten wordt gebruikt, een verhoging van de NADH/NAD⁺-ratio optreedt. Maar toevoeging van 25 mM ethanol wat eenzelfde effect zou moeten geven, gaf geen verhoging van de ijzermobilisatie. Dit zou betekenen dat de ijzermobilisatie door citraat zuiver zou berusten op zijn chelerende eigenschappen of compartimentalisatie van de reductieve ijzermobilisatie.

Uit klinische experimenten waarbij ijzeroverladen patiënten behandeld werden met desferrioxamine is bekend dat ijzermobilisatie een zeer langzaam proces is, wat in overeenstemming is met onze resultaten. Opgemerkt dient te worden dat wij een desferrioxamineconcentratie gebruiken die ongeveer 50 maal hoger is dan de concentratie die in plasma bereikt wordt gedurende de therapie bij ijzeroverladen patiënten¹⁹. Tevens moet men zich realiseren dat in deze experimenten de hoeveelheid ijzer die gemobiliseerd is, gemeten is buiten de cel. Niet bekend is of het gemobiliseerde ijzer afkomstig is uit ferritine en gebonden is door een chelator

dat als ijzer-chelatorcomplex de celmembraan moeilijk kan passeren.

Uit de gelfiltratie van het 100.000 g cytosol dat verkregen is op verschillende tijdstippen gedurende de incubatie van geïsoleerde rattehepatocyten met desferrioxamine en desferrioxamine samen met ascorbinezuur, blijkt dat hoewel ferritine zijn ijzer verliest, toch een aanzienlijke hoeveelheid ijzer binnen de cel achterblijft die langzaam aan het incubatiemedium wordt afgegeven. Ook blijkt dat wanneer ascorbinezuur aan het incubatiemedium (waarin ook desferrioxamine) wordt toegevoegd maar een kleine verhoging van de ijzermobilisatie van ferritine optreedt. Het resulteerde in een verhoging van het ijzer-chelatorcomplex (ferrioxamine). Toevoeging van ascorbinezuur verhoogde de intracellulaire ijzermobilisatie maar had geen verhoging van de ijzerafgifte in het incubatiemedium tot gevolg.

Deze in vitro resultaten spreken gedeeltelijk de resultaten tegen van klinische waarnemingen dat ascorbaat in combinatie met desferrioxamine de ijzerexcretie verhoogt bij ijzeroverladen patiënten (Jacobs et al.¹⁵). Het is natuurlijk wel mogelijk dat ascorbaat ijzermobilisatie uit een ander compartiment (RES?) stimuleert wat wij met onze hepatocytensuspensie niet kunnen aantonen.

Belangrijk is om in de toekomst te onderzoeken wat de eigenschappen zijn van nieuwe ijzerchelatoren. Uit onze experimenten blijkt dat het van belang is dat ijzer op voldoende hoge snelheid gemobiliseerd wordt maar dat tevens van belang is dat zowel de chelator als het ijzer-chelatorcomplex gemakkelijk de celmembraan kunnen passeren.

Literatuur

- 1 Crichton, R.R., Roman, F., Wauters, M. Reductive mobilization of ferritin iron by reduced nicotinamide-adenin dinucleotide flavin mononucleotide. *Biochem. Soc. Trans.* 3, 1975, 946-948.
- 2 Funk, F., Lenders, J.-P., Crichton, R.R., Schneider, W. Reductive mobilization of ferritin iron. *Eur. J. Biochem.* 152, 1985, 167-172.
- 3 Baker, E., Morton, A.G., Tavill, A.S. In: *Proteins of iron storage and transport in biochemistry and medicine I*, editors A. Jacobs, M. Worwood, Academic Press, London and New-York, 1974, pp. 173-180.
- 4 Baker, E., Morton, A.G., Tavill, A.S. The regulation of iron release from the perfused rat liver. *Br. J. Haemat.* 45, 1980, 607-620.
- 5 Baker, E., Vicary, F.R., Huehns, E.R. Iron release from isolated hepatocytes. *Br. J. Haemat.* 47, 1981, 493-504.
- 6 Baker, E., Morgan, E.H. Transferrin and iron release from rat hepatocytes in culture. *Am. J. Physiol.* 248, 1985, G93-G97.
- 7 Corthier, G., Boschetti, E., Charley-Poulain, J. Improved method for IgG purification from various animal species by ion exchange chromatography. *J. Immunol. Meth.* 66, 1984, 75-79.
- 8 Sirivech, S., Frieden, F., Osaki, S. The release of iron from horse spleen ferritin by reduced flavins. *Biochem. J.* 143, 1974, 311-315.
- 9 Crichton, R.R., Roman, F., Roland, F. Iron mobilization from ferritin by chelating agents. *J. Inorg. Biochem.* 13, 305-316, 1980.
- 10 Jones, T., Spencer, R. Walsh, C. Mechanism and kinetics of iron release from ferritin dihydroflavins and dihydroflavin analogues. *Biochemistry* 17, 1978, 4011-4017.
- 11 Rowley, B., Sweeney, G.D. Release of iron from ferritin by liver microsomes; a possible role in the toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Can. J. Biochem. cell. Biol.* 62, 1293-1300, 1984.
- 12 Wapnick, A.A., Lynch, S.R., Charlton, R.W., Seftel, H.C., Bothwell, T.H. The defect of ascorbic acid deficiency on desferrioxamine-induced urinary iron excretion. *Br. J. Haemat.* 17, 563-568, 1969.
- 13 O'Brien, R.T., Ascorbic acid enhancement of desferrioxamine-induced urinary iron excretion in thalassemia major. *Ann. New York Acad. Sci.* 232, 221-225, 1974.
- 14 Propper, R.D., Cooper, B., Rofo, R.R., Nienhuis, A.W., Anderson, A.W., Franklin Bunn, H., Rosenthal, A., Nathan, D.G. Continuous subcutaneous administration of

- desferrioxamine in patients with iron overload. *New Engl. J. Med.* 297, 418-423, 1977.
- 15 Jacobs, A. Disorders of iron metabolism. In: *Clinics in Haematology*, vol 4, no. 2, W.B. Saunders, London, 1982, pp. 453-454.
 - 16 Octave, J.-N., Schneider, Y.-J., Crichton, R.R., Trouet, A. Iron mobilization from cultured hepatocytes: effect of desferrioxamine. *B. Biochem. Pharmac.* 32, 3413-3418, 1983.
 - 17 Ponka, P., Grady, R.W., Wiczynska, A., Schulman, H.M. The effect of various chelating agents on the mobilization of iron from reticulocytes in the presence and absence of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone. *Biochim. Biophys. Acta* 802, 477-489, 1984.
 - 18 Ponka, P., Borova, J., Neuwirt, J., Fuchs, O. A study of intracellular iron metabolism using pyridoxal isonicotinoyl hydrazone and other synthetic chelating agents. *Biochim. Biophys. Acta* 586, 278-296, 1979.
 - 19 Summers, M.R., Jacobs, A., Tudway, D., Perera, P., Ricketts, C. Studies in desferrioxamine and ferrioxamine metabolism in normal and iron-loaded subjects. *Br. J. Haemat.* 42, 547-555, 1979.

Hoofdstuk 4

Hoofdstuk 4.

4.1. IJzerchelatoren en lipide-peroxidatie.^c

Bijna al het intracellulaire ijzer is opgeslagen in ferritine. Deze opslag wordt algemeen beschouwd als een beschermend mechanisme voor de toxiciteit van "vrij" ijzer dat in staat is om de vorming van hydroxylradicalen^{1,2,3} te katalyseren. Desferrioxamine is de enige ijzerchelator die klinisch wordt gebruikt voor de behandeling van patiënten met secundaire hemochromatose. De behandeling van deze patiënten met desferrioxamine is kostbaar. Desferrioxamine is niet oraal actief zodat toediening hetzij via intramusculaire injecties of met een continue s.c. infuus dient te geschieden wat jonge β -thalassemie patiënten aanleiding geeft tot therapieontrouw. Een aantal ijzerchelatoren is werkzaam wanneer zij oraal worden toegediend aan proefdieren maar geen van deze ijzerchelatoren heeft op dit ogenblik het stadium bereikt dat zij uitgetest zijn bij mensen d.m.v. clinical trials.

IJzer dat gebonden is aan bepaalde chelatoren kan het proces van lipide-peroxidatie en andere vormen van vrije radicaalvorming stimuleren (bijvoorbeeld Fe^{3+} -EDTA). Het complexgebonden ijzer kan als katalysator dienen in de Haber-Weiss reactie (zie hoofdstuk 1) waarbij het reactieve hydroxylradicaal wordt gevormd. Dit is schadelijk voor de cel vanwege de interacties met eiwitten, onverzadigde vetzuren en nucleïnezuren. Andere chelatoren binden het ijzer zodanig dat het niet meer als katalysator in de Haber-Weiss reactie kan fungeren (bijv. desferrioxamine). Daarom is het van belang om bij de behandeling van β -thalassemie te vermijden dat een ijzerchelator wordt gebruikt waarvan het ijzer-chelatorcomplex de katalyse van lipide-peroxidatie stimuleert.

^c Gepubliceerd in Free Radical Research Communications 3, 379-388, 1987.

In dit hoofdstuk wordt een testsysteem besproken voor ijzerchelatoren dat de volgende aspecten belicht:

- ijzermobilisatie uit ferritine
- de intracellulaire ijzermobilisatie van ^{59}Fe uit ^{59}Fe -gemerkte hepatocyten
- de eigenschap van het ijzer-chelatorcomplex om het proces van lipide-peroxidatie te stimuleren

Elf ijzerchelatoren werden onderzocht waaronder chelatoren met een hydroxypyridon-ijzerbindingsplaats die al eerder effectief bleken te zijn bij de mobilisatie van ijzer uit transferrine⁴ en ferritine⁵ zowel in vitro als in vivo.

4.2. Materiaal en methoden

4.2.1. Chemicaliën

Alle reagentia waren van pro-analyse kwaliteit. Desferrioxamine, DTPA en desferrithiocine werden verkregen van Ciba-Geigy (Zwitserland). 1,2-Dimethyl-3-hydroxy-4-pyridon (L1) werd verkregen volgens een methode van Kontoghiorghes⁶ die ongeveer gelijk was aan een voorschrift voor de synthese van andere pyridonderivaten⁷. 2-hydroxypyridine-N-oxide (L6) werd gesynthetiseerd volgens een voorschrift van Mizukami et al.⁸. 2-Hydroxypyridine-N-oxide (L4), 2-methyl-3-hydroxy-4-pyron (maltol) en 2-hydroxy-5-hydroxymethyl-4-pyron (Kojic acid) werden verkregen van Aldrich (Gillingham, U.K.). 1-Aminopropionzuur-3-hydroxy-4-pyron (mimosine), 3,4-dihydroxybenzoëzuur, 8-hydroxychinoline en 2-mercaptopyridine-N-oxide (Omadine) werden verkregen van Sigma (St. Louis, USA). De structuurformules van de gebruikte chelatoren zijn vermeld in Tabel I.

De bereiding van de hepatocytensuspensie, homogeen radioactief gemerkt ferritine is in hoofdstuk 2 besproken.

4.2.2. Evenwichtsdialyse van chelatoren tegen ^{59}Fe -gemerkt ferritine

Homogeen radioactief gemerkt (paardemilt) ferritine werd verdund met 0.1 M fosfaatbuffer pH 7.4 tot een eindvolume van 8 ml. De

eiwitconcentratie bedroeg 150 μg ferritine/ml en het ferritine bevatte 2200 ± 100 Fe-atomen per molecuul. De chelator werd opgelost in 8 ml 0.1 M fosfaatbuffer pH 7.4 tot een eindconcentratie van 2.5 mM.

Vervolgens werden de ferritine- en chelator oplossing gedialyseerd in een dialysator met tegenstroom-principe. De oplossingen werden gescheiden door een semi-permeabele membraan die de chelatormoleculen en de ijzer-chelatorcomplexen wel doorliet maar de ferritinemoleculen niet. De pompsnelheid bedroeg 4 ml/min.. Op verschillende tijdstippen werd 1 ml van de chelatoroplossing geteld in een gammacounter en vervolgens weer toegevoegd aan de oplossing. De ijzermobilisatie kan vervolgens berekend worden uit het aantal cpm aanwezig in de chelatoroplossing op tijdstip t en het totaal aantal cpm dat aanwezig was in ferritine op tijdstip $t=0$.

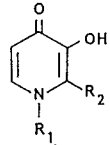
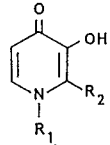
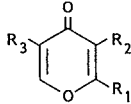
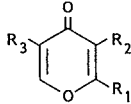
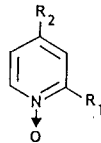
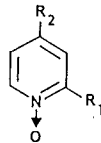
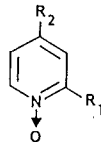
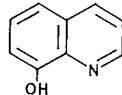
Aan het eind van het dialyse-experiment werd ter controle in zowel chelator- als ferritineoplossing totaal ijzer, na een Kjeldahl-destructie, spectrofotometrisch met behulp van ferrozine bij 562 nm bepaald. Er was een goede correlatie (0.993) tussen ^{59}Fe en totale ijzer-mobilisatie gemeten met de twee methoden.

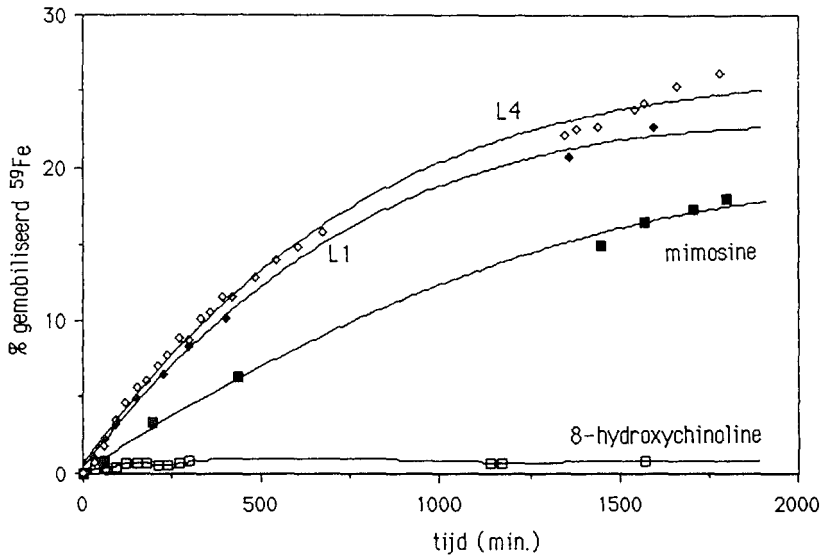
4.2.3. Inhibitie van microsomale lipide-peroxidatie geïnduceerd door middel van Fe^{3+} /ADP en NADPH

Microsomen werden geïsoleerd volgens een eerder beschreven methode⁹ en opgelost in Tris-HCl 1 M, pH 7.5, zodanig dat de eiwitconcentratie 1 mg/ml bedroeg. Een controle-mengsel werd bereid door een oplossing van Fe^{3+} (eindconcentratie 0.1 mM), ADP (eindconcentratie 0.5 mM) en NADPH (eindconcentratie 0.4 mM) toe te voegen aan de microsomen bevattende oplossing. Vervolgens werden monsters genomen op $t=0, 5, 10, 15$ en 20 minuten. In alle monsters werd het gevormde malondialdehyde spectrofotometrisch bepaald¹⁰.

Het effect van de chelatoren op de lipide-peroxidatie werd onderzocht door aan het incubatiemengsel een 4-voudige overmaat chelator t.o.v. ijzer toe te voegen. De extinctie bij 532 nm werd uitgezet tegen de tijd. Op $t=20$ min. werd de extinctie van het con-

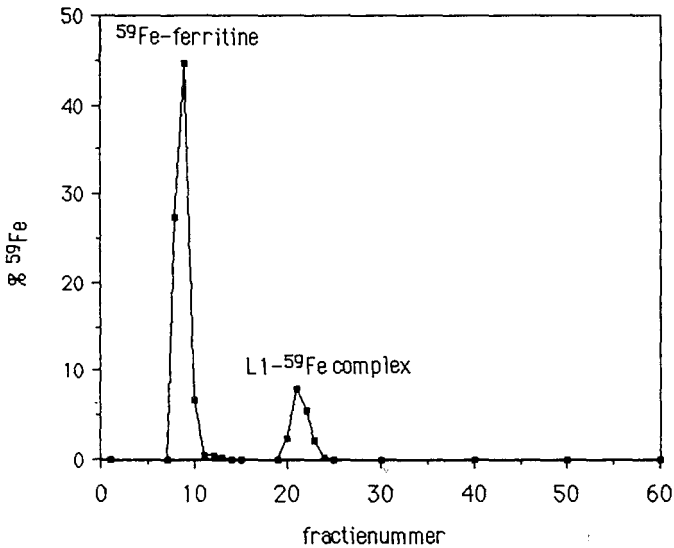
Tabel I.
Overzicht van de gebruikte chelatoren.

Chelator	Chemische formule	Structuurformule	Substituenten
L1	1,2-dimethyl-3-hydroxypyrid-4-on		$R_1 = -CH_3$ $R_2 = -CH_3$
Mimosine	1-aminopropionyl-3-hydroxypyrid-4-on		$R_1 = -CH_2-\underset{\text{NH}_2}{\underset{ }{\text{CH}}}-COOH$ $R_2 = -H$
Kojiczuur	5-hydroxy-2-hydroxymethylpyr-4-on		$R_1 = -CH_2OH$ $R_2 = -H$ $R_3 = -OH$
Maltol	2-methyl-3-hydroxypyr-4-on		$R_1 = -CH_3$ $R_2 = -OH$ $R_3 = -H$
L4	2-hydroxypyridine-N-oxide		$R_1 = -OH$ $R_2 = -H$
L6	2-hydroxy-4-methoxypyridine-N-oxide		$R_1 = -OH$ $R_2 = -OCH_3$
Omadine	2-mercaptopyridine-N-oxide		$R_1 = -SH$ $R_2 = -H$
8-hydroxychinoline			



Figuur 1.

Evenwichtsdiïlyse van ^{59}Fe -gemarkt paardemiltferritine tegen chelator opgelost in 0.1 M fosfaatbuffer pH 7.4. De ferritine-concentratie is 125 $\mu\text{g/ml}$, de chelatorconcentratie is 1.25 mM. Het ferritine bevat 2200 Fe-atomen per molecuul.



figuur 2.

Gelfiltratie van het 80.000 g cytosol van L1 over Sephadex G-50.

trole-mengsel op 100% lipide-peroxidatie gesteld zodat met de extinctie op $t=20$ min. van de chelatoroplossing het percentage katalyse van de lipide-peroxidatie kon worden berekend (vergelijking 1).

$$\frac{E_{532 \text{ nm}} \text{ chelator (t=20)}}{E_{532 \text{ nm}} \text{ controle (t=20)}} * 100 \% \quad (1)$$

4.3. Resultaten

4.3.1. IJzermobilisatie uit ferritine

Voor de ijzerchelatoren L1, mimosine en 8-hydroxychinoline is de ijzermobilisatie uit ferritine uitgezet tegen de tijd (figuur 1). Het percentage ^{59}Fe dat in 24 uur uit ferritine door de chelator is gemobiliseerd is weergegeven in Tabel II.

4.3.2. Intracellulaire ijzeraccumulatie

Een typisch elutieprofiel van het 80.000 g cytosol van de ^{59}Fe -gemerkte hepatocyten na incubatie gedurende 80 min. met L1 over Sephadex G-50 is te zien in figuur 2. Naast een hoog percentage ^{59}Fe in ferritine (dode volume) is ook een deel van het ijzer aanwezig in een laag-moleculair complex. De vorming van een laag-moleculaire ijzerpool geïnduceerd door de chelatoren is weergegeven in Tabel III. De chelatoren L1, maltol, mimosine, desferrioxamine en DTPA gaven een sterkere intracellulaire ijzeraccumulatie te zien dan de overige chelatoren. Aan het einde van elk incubatie-experiment werd het percentage levende cellen bepaald met Trypan Blue en LDH-bepalingen in het incubatiemedium. Alleen na incubatie van hepatocyten met 8-hydroxychinoline was een enorme celsterfte te zien (96%). Incubatie met de overige chelatoren resulteerde altijd in een hoog percentage levende cellen (70-80%) op $t=80$ min, hetzelfde als de controle (= hepatocyten in incubatiemedium waaraan geen chelator was toegevoegd).

Tabel II.

IJzermobilisatie uit met ^{59}Fe -gemerkt paardemiltferritine. De ferritine-concentratie is 150 $\mu\text{g/ml}$, chelator 1.3 mM, het ferritine bevat 2200 Fe-atomen per molecuul.

Chelator	% ijzermobilisatie in 24 uur*
desferrioxamine	12
L1	21
L4	23
Maltol	9
L6	16
Mimosine	14
Omadine	2
Kojiczuur	6
8-hydroxychinoline	1
3,4 dihydroxybenzoëzuur	3
DTPA	5
desferrithiocin	6

*duplo's verschillen minder dan 5%

Tabel III.

Intracellulaire LMW ^{59}Fe -pool geïnduceerd door chelatoren in de hepatocyt.

Chelator	lading	polariteit ijzercomplex	%LMW ^{59}Fe *
desferrioxamine	geladen	hydrofiel	4.6
L1	neutraal	hydrofiel	7.2
L4	geladen	lipofiel	0.9
Maltol	neutraal	lipo/hydrofiel	3.7
L6	geladen	lipofiel	0.4
Mimosine	geladen	hydrofiel	4.3
Omadine	geladen	lipofiel	0.7
Kojiczuur	neutraal	hydrofiel	0.3
8-hydroxychinoline	neutraal	lipofiel (cytotoxisch)	0
3,4 dihydroxybenzoëzuur	geladen	lipo/hydrofiel	0.6
DTPA	geladen	hydrofiel	6.7
desferrithiocin	geladen	hydrofiel	7.8

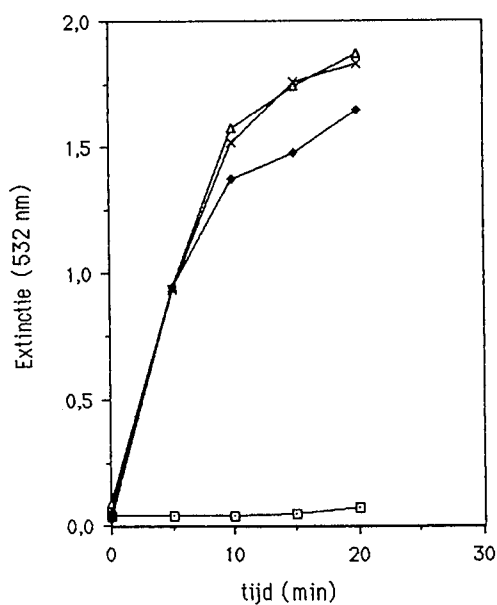
*duplo's verschillen minder dan 3%

Tabel IV.

Percentage katalyse door het ijzer-chelatorcomplex van microsomale lipide peroxidatie geïnduceerd door Fe^{3+} /ADP en NADPH.

Chelator	% katalyse lipide peroxidatie*
Fe^{3+} /ADP	100
desferrioxamine	0
L1	0
L4	87
Maltol	100
L6	82
Mimosine	0
Omadine	0
Kojiczuur	100
8-hydroxychinoline	0
3,4 dihydroxybenzoëzuur	85
DTPA	0
desferrithiocin	65

*duplo's verschillen minder dan 5%



figuur 3. Microsomale lipide peroxidatie geïnduceerd door Fe^{3+} /ADP en NADPH. Rattelever microsomen 1 mg (eiwit)/ml, ADP 0.4 mM, Fe^{3+} 0.1 mM, NADPH 0.4 mM, chelator 0.4 mM.

□ L1
 ◆ L4
 △ Maltol
 * Fe^{3+} /ADP

4.3.3. Lipide-peroxidatie

Het effect van L1, L4 en maltol op de microsomale lipide-peroxidatie vergeleken met het effect van $\text{Fe}^{3+}/\text{ADP}$ op de microsomale lipide-peroxidatie is weergegeven in figuur 3. Tabel IV geeft een overzicht van de resultaten die verkregen zijn met de verschillende chelatoren wat betreft de mogelijkheid lipide-peroxidatie te katalyseren.

4.3.4. IJzermobilisatie uit ^{59}Fe -gemerkte hepatocyten

Omdat L1 en mimosine het hoogste percentage ijzer uit ferritine konden onttrekken en geen lipide-peroxidatie veroorzaakten werd onderzocht of deze chelatoren ijzer konden onttrekken aan radio-actief gemerkte rattehepatocyten. Hierbij werd desferrioxamine meegenomen als een soort referentie waarmee de twee chelatoren werden vergeleken. Uit Tabel V blijkt dat L1 eenzelfde hoeveelheid ijzer mobiliseert als desferrioxamine terwijl mimosine hiertoe niet in staat blijkt.

Tabel V.

IJzermobilisatie uit ^{59}Fe -gemerkte rattehepatocyten door de chelatoren L1, mimosine, en desferrioxamine. De hepatocyten suspensie bevat $1-3 \cdot 10^7$ hepatocyten/ml, de incubatietemperatuur is 37°C , de chelatorconcentratie is 1 mM.

<u>% ^{59}Fe mobilisatie in 1 uur</u>	<u>exp. 1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>gem. \pm SD</u>
desferrioxamine	0.86	0.78	0.73	0.79 ± 0.05
L1	0.92	1.12	0.97	0.97 ± 0.11
Mimosine	0.25	n.b.*	0.15	0.20 ± 0.05

*niet bepaald

4.4. Discussie

Naast de in de inleiding beschreven eigenschappen, moet een "ideale" ijzerchelator voldoen aan de volgende criteria. Ten eerste moet de chelator in staat zijn om ijzer te mobiliseren uit ferritine omdat het meeste ijzer in het lichaam wordt opgeslagen in ferritine en/of hemosiderine. Het beste, in vergelijking met desferrioxamine, waren daartoe in staat L1, L4, L6 en mimosine (Tabel II).

Ten tweede moet de chelator in staat zijn om het vrijgemaakte ijzer uit de cel in de circulatie te brengen waarna faecale of urinaire excretie volgt. In Tabel III is te zien dat de chelatoren L1, maltol, mimosine, DTPA en desferrioxamine een verhoging van de intracellulaire laag moleculaire ^{59}Fe -pool (= ^{59}Fe -chelator-complex) bewerkstelligen. Met betrekking tot de chelatorstructuur kan het volgende worden opgemerkt. In het hepatocyten-cytosol accumuleren de complexen van de geladen en neutrale hydrofiele ijzerchelatoren in sterkere mate dan de lipofiele chelator-complexen mogelijk doordat de eerstgenoemde complexen hetzelfde hydrofiele karakter hebben als het cytosol. Aanvullende gegevens van desferrioxamine, L1 en mimosine, weergegeven in Tabel V, laten zien dat er een verhoogde ijzerafgifte is uit hepatocyten. Er is een goede correlatie tussen de ijzerafgifte uit ferritine (figuur 1, Tabel II) en hepatocyten (Tabel V) na een korte incubatie (80 minuten) van hepatocyten met desferrioxamine, L1 en mimosine. De ijzerafgifte is traag wanneer men zich de totale hoeveelheid ijzer die opgeslagen is realiseert, hetgeen indicatief is voor de problemen die een rol spelen bij de ijzermobilisatie uit polynucleaire ijzerkernen⁵ in vitro en in ijzeroverladen patiënten.

Een derde belangrijk criterium voor ijzerchelatoren die klinisch gebruikt gaan worden is dat de ijzer-chelatorcomplexen niet toxisch mogen zijn. Toxiciteit kan mogelijk toegeschreven worden aan lipide-peroxidatie door het ijzer-chelatorcomplex.

Om deze redenen is het bijzonder belangrijk om te onderzoeken of de ijzercomplexen in staat zijn om de lipide-peroxidatie te katalyseren. Wij veronderstellen dat chelatoren waarvan de ijzer-chelatorcomplexen lipide-peroxidatie katalyseren (Tabel IV) niet verder bruikbaar zijn voor voortgezette in vivo screeningprocedures. Andere vormen van toxiciteit bijvoorbeeld cytotoxiciteit dienen ook onderzocht te worden omdat hierbij verbindingen aan het licht komen die mogelijk geen lipide-peroxidatie katalyseren maar wel sterk toxisch voor de cel zijn zoals bijvoorbeeld 8-hydroxychinoline.

Wanneer de resultaten van alle experimenten gecombineerd worden (Tabel II, III en IV) blijkt dat slechts twee chelatoren, L1 en mimosine, aan de drie gestelde criteria voldoen en mogelijk interessant zijn om in de kliniek gebruikt te gaan worden. Opgemerkt dient te worden dat L1 reeds intragastricaal toegediend is aan normale en ijzeroverladen muizen¹¹ en even effectief was als subcutaan toegediend desferrioxamine. In ijzeroverladen konijnen is oraal toegediend L1 ongeveer even effectief als subcutaan toegediend desferrioxamine¹².

Geconcludeerd kan worden dat ons testsysteem bruikbaar kan zijn voor een eerste screening van ijzerchelatoren die mogelijk klinisch gebruikt gaan worden.

Literatuur

- 1 Butler, J., Halliwell, B. Reaction of iron-EDTA chelates with the superoxide radical. *Biochim. Biophys. Acta* 218, 174, 1982.
- 2 Gutteridge, J.M.C., Rowley, D.A., Griffiths, E., Halliwell, B. Low-molecular iron complexes and oxygen radical reactions in idiopathic haemochromatosis. *Clin. Sci.* 68, 463, 1985.
- 3 Grat, E., Mahoney, J.R., Bryant, R.G., Eaton, J.W. Iron-catalyzed hydroxyl radical formation. *J. Biol. Chem.* 259, 3620, 1984.
- 4 Kontoghiorghes, G.J., The study of iron mobilisation from transferrin using α -ketohydroxy heteroaromatic chelators. *Biochim. Biophys. Acta* 869, 141, 1986.
- 5 Kontoghiorghes, G.J., The study of iron mobilisation from ferritin using α -oxyhydroxy heteroaromatic chelators. *Biochem. J.* 233, 299, 1986.
- 6 Kontoghiorghes, G.J., The design of orally active iron chelators for the treatment of thalassaemia. Ph.D. thesis, University of Essex, 1982.
- 7 Harris, R.L.N. Potential wool growth inhibitors. Improved synthesis of mimosine and related 4-(IH)-pyridones. *Aust. J. Chem.* 29, 1329, 1976.
- 8 Mizukami, S., Hirai, E., Morimoto, M. A new series of pyridine-N-oxides. *Annual Report Shionogi Research Laboratory* 16, 29, 1966.
- 9 Wills, E.D. Lipid peroxidation in microsomes. *Biochem. J.* 113, 315, 1969.
- 10 Ottolenghi, H. Interaction of ascorbic acid and mitochondrial lipids. *Arch. Biochem. Biophys.* 79, 355, 1959.
- 11 Kontoghiorghes, G.J. New orally active iron chelators. *Lancet* ii, 817, 1985.
- 12 Kontoghiorghes, G.J., Hoffbrand, A.V. Orally active α -ketohydroxy pyridine iron chelators intended for clinical use: in vivo studies in rabbits. *Brit. J. Haemat.* 43, 443, 1979.

Hoofdstuk 5

Hoofdstuk 5

5.1 Bestudering van ferritine in rattelever en -milt gedurende flebotomie^d

De toxiciteit van het ijzerion voor de cel is algemeen bekend. In de dierlijke cel wordt de toxiciteit van vrij ijzer gereduceerd door opslag in speciale eiwitten. Er zijn twee opslagvormen van niet aan heem gebonden ijzer bekend: ferritine en hemosiderine. Ferritine is samengesteld uit een wateroplosbare eiwitmantel en een electronendichte ijzerkern met een diameter van ongeveer 6 nm¹, waardoor deze zichtbaar is door middel van de electronen-microscop. Hemosiderine is een onoplosbare verbinding waarvan de exacte samenstelling nog niet geheel bekend is. Er wordt verondersteld dat het een gepolymeriseerde² of gedegradeerde³ vorm van ferritine is waarvan de ijzerkern sterk lijkt op die van ferritine.

De lever en de milt zijn de belangrijkste organen voor de normale ijzeropslag. De hoeveelheid ferritine en hemosiderine fluctueert met de vraag van het lichaam naar ijzer. Ijzer dat de leverparenchymcel, de leversinusoïdale cel of de miltmacrofaag binnenkomt, stimuleert de ferritinesynthese. Hoe meer ijzer de cel binnenkomt des te meer ijzerkernen er zichtbaar zijn in het cytoplasma en in lysosomale structuren.

Hoewel er veel bekend is over de ijzeropname en de ijzerdistributie over de organen en cellulaire componenten^{4,5,6,7} is het mechanisme dat ten grondslag ligt aan mobilisatie van ijzer nog steeds niet bekend. Zowel in vivo als in vitro zijn experimenten uitgevoerd om een mogelijk mechanisme voor ijzermobilisatie uit de cel vast te stellen^{8,9,10,11,12}.

Heemsynthese wordt gestimuleerd wanneer bloed uit het lichaam wordt verwijderd. Door middel van herhaalde flebotomie wordt ijzer gemobiliseerd uit de ijzervoorraden.

^d Gepubliceerd in International Journal of Biochemistry 21, 39-47, 1989.

In deze studie werd de ijzermobilisatie na herhaalde flebotomie bekeken waarbij twee groepen ratten, één normale groep ratten en een ijzeroverladen groep ratten, werden gebruikt. Biochemische en electronen-microscopische gegevens werden gecombineerd om antwoord te krijgen op de volgende drie vragen:

- Welke celtypes in de lever en milt zijn betrokken bij het proces van ijzeropslag en ijzermobilisatie?
- Uit welke celorganellen wordt ferritine ijzer in de tijd gemobiliseerd?
- Is er sprake van reductieve ijzermobilisatie of wordt ferritine in zijn geheel afgebroken?

5.2 Materiaal en methoden

5.2.1 Proefdieren

Twee groepen van 42 ratten (Wistar) werden gebruikt resp. één normale en één ijzeroverladen groep. IJzeroverladen ratten werden verkregen door 4 intramusculaire injecties Imferon (ijzerdextraan), Fisons, U.K.) te geven met een totale dosis van 100 mg Fe^{3+} over een periode van drie weken. Aan deze ratten werd ook standaard korrelvoer gegeven dat verrijkt was met 1 mg Fe/g voer. Na de laatste Imferoninjectie werden de ratten voor een periode van twee weken met rust gelaten. De normale ratten werden niet behandeld en kregen standaard korrelvoer te eten.

Na deze periode werd aan beide groepen ratten ijzerarm voer (15 μg Fe/g) en aqua bidest. gegeven. Om de vijf dagen werd een orbita punctie uitgevoerd waarbij 4 ml bloed werd verwijderd. Hemoglobine, serum ijzer, totale ijzerbindingscapaciteit (TIBC) en de transferrinesaturatie werden direct na iedere orbitapunctie bepaald. Drie dagen na iedere orbitapunctie werden van elke groep ratten 5-7 ratten opgeofferd en de lever en milt na perfusie met 0.15 M NaCl verwijderd. Een klein deel van de weefsels werd apart behandeld voor electronen-microscopisch onderzoek, de rest werd ingevroren bij -70°C .

5.2.2 Bereiding van weefselhomogenaten

Een gram weefsel werd met behulp van een Vibra Cell Homogenizer in 4 ml aqua bidest gesonificeerd. Na het meten van het volume werd het homogenaat ingevroren bij -70°C .

5.2.3 Bepaling van ferritine in weefselhomogenaten

Rattelever en rattemilt ferritine werden gezuiverd volgens Penders et al.¹³ en werden gebruikt voor de bereiding van een serie standaardoplossingen. Ferritine (eiwit) in de standaardoplossingen werd gemeten met een eiwitbepaling volgens Markwell¹⁴ waarbij BSA als eiwitstandaard werd gebruikt.

Anti-lichamen tegen rattelever- en -miltferritine werden opgewekt in konijnen en na zuivering gebruikt voor de radiale immunodiffusie-techniek volgens Mancini¹⁵. Tien μl homogenaat (zie 5.2.2) werd op de anti-ferritine bevattende gel gebracht evenals de bereide standaardoplossingen van gezuiverd ferritine. De immunoprecipitatieringen werden zichtbaar gemaakt door middel van een ijzerkleuring met 0.1 M $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ in 0.3 M trichloorazijnzuur. Met behulp van de calibratiecurve werd de hoeveelheid ferritine in de homogenaten berekend.

5.2.4 Bepaling van de ijzersaturatie van ferritine

Een gezuiverde anti-ratteleverferritine werd gekoppeld aan Sepharose-CNBr. Een ml weefselhomogenaat werd gedurende een nacht geïncubeerd met de anti-ferritine bevattende Sepharosebolletjes. Met behulp van met ^{59}Fe gemerkt rattelever- en rattemiltferritine was bepaald dat de Sepharose-bolletjes 2-5 μg ferritine konden binden. Na centrifugeren werd de ferritine bevattende pellet twee maal gewassen met 0.15 M NaCl. Vervolgens werd ijzer fotometrisch bepaald met Ferene-S (Sigma) bij een golflengte van 595 nm. Uit de verhouding ijzer/eiwit kon de ijzersaturatie (=Fe-atomen per ferritinemolecuul) worden berekend.

5.2.5 Electronen-microscopie

Weefsel bestemd voor electronen-microscopie werd gedurende twee uur bij 4°C gefixeerd in 2% paraformaldehyde en 1% glutaraaldehyde in 0.1 M cacodylaatbuffer pH 7.4. De helft van het aantal weefselblokjes werd gedurende twee uur onderworpen aan een postfixatie in 1% OsO₄ in 0.1 M cacodylaatbuffer bij 4°C. Na dehydratie in ethanol en propyleenoxide werden de weefselblokjes ingebed in Epon 512. Vervolgens werden ultra-dunne coupes gesneden (70 nm) en zonder additionele kleuring met zware metalen bekeken onder een Zeiss EM 902 transmissie electronen-microscop (TEM) met een ingebouwde spectrometer. In de ESI-stand (Electron Spectroscopic Imaging) geeft dit instrument een TEM-beeld van uitsluitend monochromatische electronen waardoor een helder beeld met een hoog oplossend vermogen wordt verkregen. In de EELS-stand (Electron Energy Loss Spectroscopy) wordt de afbeelding verzorgd door monochromatische electronen die een element-specifiek energieverlies (in ons geval FeL_{2,3})^{16,17,18} hebben geleden.

5.3 Resultaten

5.3.1 Hematologische gegevens

De hemoglobineconcentratie in beide groepen ratten werd wekelijks na iedere orbitapunctie gevolgd. De resultaten zijn weergegeven in figuur 1. De daling van de hemoglobineconcentratie was significant tussen dag 1 en 6 ($p < 0.001$), maar niet meer significant tussen dag 6 en dag 23 ($p > 0.2$).

Gegevens over serum ijzer, totale ijzerbindingscapaciteit en het percentage transferrinesaturatie zijn vermeld in Tabel I.

5.3.2 Ferritinegehalte in de lever en milt gedurende ijzeronttrekking

In Tabel II is te zien dat het ferritinegehalte na toedienen van grote hoeveelheden ijzer ongeveer 15 maal hoger is in de lever en zes maal in de milt in vergelijking met normale ratten. Wanneer ijzer wordt onttrokken door herhaalde flebotomie daalt het ferri

Tabel I.

Serumijzer, TIBC en transferrine-ijzersaturatie van normale en ijzeroverladen ratten gedurende herhaalde flebotomie.

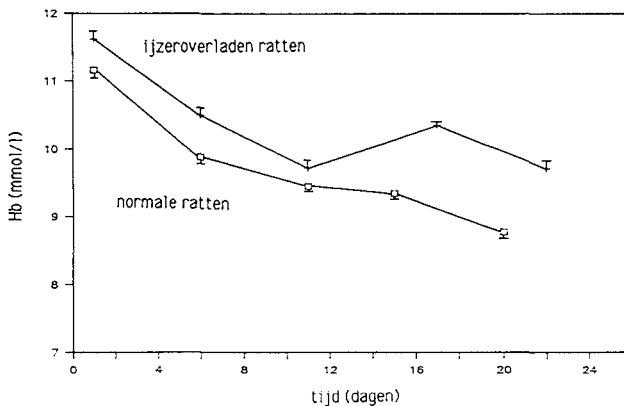
normale ratten*

ml bloed verwijderd	serum Fe (μM)	TIBC (μM)	% Tf saturatie
0	26.7 ± 2.7	61.3 ± 10.1	43.6
1 x 4	24.8 ± 1.3	66.5 ± 12.3	37.3
2 x 4	22.6 ± 2.5	67.2 ± 15.7	33.6
3 x 4	17.7 ± 3.0	69.3 ± 11.9	25.4
4 x 4	15.2 ± 1.7	68.7 ± 12.2	22.1
5 x 4	13.2 ± 2.1	69.5 ± 13.8	10.9

ijzeroverladen ratten*

ml bloed verwijderd	serum Fe (μM)	TIBC (μM)	% Tf saturatie
0	54.5 ± 5.7	68.1 ± 13.6	80.0
1 x 4	59.2 ± 7.9	62.8 ± 14.2	94.3
2 x 4	55.6 ± 4.9	63.3 ± 14.6	87.8
3 x 4	52.7 ± 5.1	61.0 ± 11.8	86.4
4 x 4	53.8 ± 5.5	63.4 ± 12.9	84.9
5 x 4	51.4 ± 4.3	61.7 ± 14.5	83.3

*n = 6



figuur 1.

Hemoglobineconcentratie gedurende herhaalde flebotomie. Er is een significant verschil ($p < 0.001$) in de Hb-concentratie op dag 1 en 5 bij zowel normale als ijzeroverladen ratten. Het Hb van ijzeroverladen ratten is significant hoger ($p < 0.001$) dan het Hb van normale ratten.

ritinegehalte in de lever van zowel normale als ijzeroverladen ratten (Tabel II). In beide groepen ratten vertoont de lever een veel geleidelijker afname in ferritine dan de milt.

5.3.3 IJzersaturatie van ferritine in de lever en milt van normale ratten na ijzeronttrekking

Gedurende de periode waarin de ratten werden onderworpen aan herhaalde flebotomie werd de ijzersaturatie van het ferritine in de lever en milt bepaald. De resultaten zijn weergegeven in Tabel III. Het blijkt dat de ferritine ijzersaturatie niet significant verandert gedurende de periode dat ijzer wordt onttrokken (p-waarden zie Tabel III).

5.3.4 Electronen-microscopie

De resultaten van het electronen-microscopisch onderzoek worden in verband met de overzichtelijkheid in twee gedeelten behandeld resp. vòòr flebotomie en na flebotomie.

5.3.4.1 Voor flebotomie.

In geosmificeerde, ongekleurde levercoupes van normale en ijzeroverladen ratten waren in het ESI-beeld bij $\Delta E=0$ eV deeltjes van ongeveer 6 nm te zien die op ferritine leken (fig. 2 en 3). Deze deeltjes bevonden zich in twee cellulaire compartimenten, resp. het cytoplasma en de lysosomen van zowel parenchymale (fig. 3) als sinusoidale cellen (= Kupffer- en endotheelcellen) (fig. 2). Analyse van deze deeltjes met behulp van EELS gaf een duidelijk te onderscheiden ijzerspectrum (inset fig. 2 en 3). Het netto ijzerbeeld (fig. 4c) van deze deeltjes werd verkregen na aftrekken van het aspecifieke EELS-beeld bij $\Delta E=690$ eV (fig. 4a) van het specifieke EELS-beeld bij $\Delta E=720$ eV (fig. 4b) met behulp van een beeldverwerkend systeem (IBAS). Dergelijke ferritinepartikels werden ook gezien in de lysosomen en het cytoplasma van de macrofagen in de milt (fig. 5). Wij vonden een opmerkelijk morfologisch verschil in het lysosomale opslagpatroon van ferritine-ijzer in parenchymale cellen in vergelijking tot sinusoidale en miltcel-

len. In de laatste celtypen was de lysosomale pakkingsdichtheid tamelijk groot maar onregelmatig (fig. 6). De ijzerbevattende lysosomen waren goed te herkennen in zowel normale als ijzeroverladen ratten. In de parenchymcellen daarentegen zagen wij de ferritinedeeltjes regelmatig gestapeld in ronde lysosomen die voornamelijk rond de galcanaliculi waren gelokaliseerd. Deze galkanalen bevatten soms nog enkele ferritine-achtige deeltjes in de ijzeroverladen groep (fig. 7). Vooral in de normale ratten waren de ijzerhoudende lysosomen tamelijk onopvallend. Alle celtypen bevatten lysosomaal ferritine.

5.3.4.2 Na flebotomie

Wanneer normale ratten gedurende herhaalde flebotomie werden gevolgd zagen wij een geleidelijke afname in de lysosomale pakkingsdichtheid van ferritine in alle levercellen en de macrofagen van de milt. Na het onttrekken van 5 x 4 ml bloed waren geen ferritine-bevattende lysosomen meer waar te nemen terwijl ook cytoplasmatisch ferritine nauwelijks meer te zien was.

Vergeleken we ijzeroverladen ratten gedurende flebotomie dan werd geen verschil in pakkingsdichtheid gezien na verwijderen van 2 maal 5 ml bloed. Echter na het verwijderen van 5 maal 4 ml bloed veranderde dit beeld wel. Hoewel alle celtypen nog steeds lysosomaal en cytoplasmatisch ferritine bevatten, was er alleen een verminderde pakkingsdichtheid van lysosomaal ferritine in alleen de sinusoïdale cellen van de lever en de macrofagen van de milt. In de parenchymcellen vonden wij nu een aantal dicht gestapelde ferritine bevattende lysosomen die peribiliair waren gelokaliseerd. Lysosomaal ferritine was te zien in de galcanaliculi zoals eerder beschreven door Cleton et al¹² wat kan wijzen op actieve secretie van ferritine (fig 8).

Tabel II.

Ferritinegehalte \pm SD (in $\mu\text{g/g}$ nat gewicht) van lever en milt gedurende herhaalde flebotomie (n=6).

	<u>normale ratten</u>		<u>ijzeroverladen ratten</u>	
ml bloed verwijderd	lever	milt	lever	milt
0	337 \pm 76	1028 \pm 126	4288 \pm 356	6431 \pm 501
1 x 4	326 \pm 61	727 \pm 186	4162 \pm 251	6367 \pm 599
2 x 4	281 \pm 78	315 \pm 55	4093 \pm 162	6293 \pm 436
3 x 4	174 \pm 80	269 \pm 106	3936 \pm 198	5968 \pm 186
4 x 4	110 \pm 58	225 \pm 150	3706 \pm 154	5034 \pm 311
5 x 4	18 \pm 13	41 \pm 73	3330 \pm 155	3956 \pm 451

Tabel III.

IJzerbelading van lever- en miltferritine van normale ratten gedurende herhaalde flebotomie. De ijzerbelading is weergegeven als het aantal Fe-atomen per ferritinemolecuul (\pm SD).

ml bloed verwijderd	n	miltferritine	leverferritine
0	5	2078 \pm 900	1701 \pm 457
1 x 4	6	2495 \pm 675	2023 \pm 678
2 x 4	5	2504 \pm 924	1589 \pm 532
3 x 4	3	1821 \pm 538	1976 \pm 851
4 x 4	4	3081 \pm 916	2235 \pm 662
5 x 4	5	1774 \pm 763	1655 \pm 769

Er is geen significant verschil in de ijzerbelading van zowel lever- als miltferritine na herhaalde flebotomie ($p > 0.3$, berekend met de Wilcoxon rank sum test).

5.4 Discussie

De beschreven experimenten werden gedaan om meer inzicht te verkrijgen in het proces van ijzermobilisatie in zowel normale als ijzeroverladen ratten wanneer deze werden onderworpen aan herhaalde flebotomie.

In figuur 1 is te zien dat het hemoglobinegehalte, gedurende de periode dat bloed wordt onttrokken aan de ratten, ongeveer constant blijft nadat het in het begin licht daalde. Uit de hematologische gegevens (Tabel I) is duidelijk te zien dat ijzergebreksanemie is geïnduceerd bij normale ratten door de herhaalde flebotomie. De bij de ijzeroverladen ratten bepaalde parameters toonden veranderingen die leken op die van patiënten met hemochromatose die worden behandeld met herhaalde flebotomie¹⁹. Uit de hematologische gegevens kan het volgende worden geconcludeerd:

1. Gedurende het experiment is de hemoglobinesynthese niet drastisch verhinderd als gevolg van de behandeling.
2. Gedurende het experiment wordt ijzer gemobiliseerd uit de voorraden om ingebouwd te worden in hemoglobine.

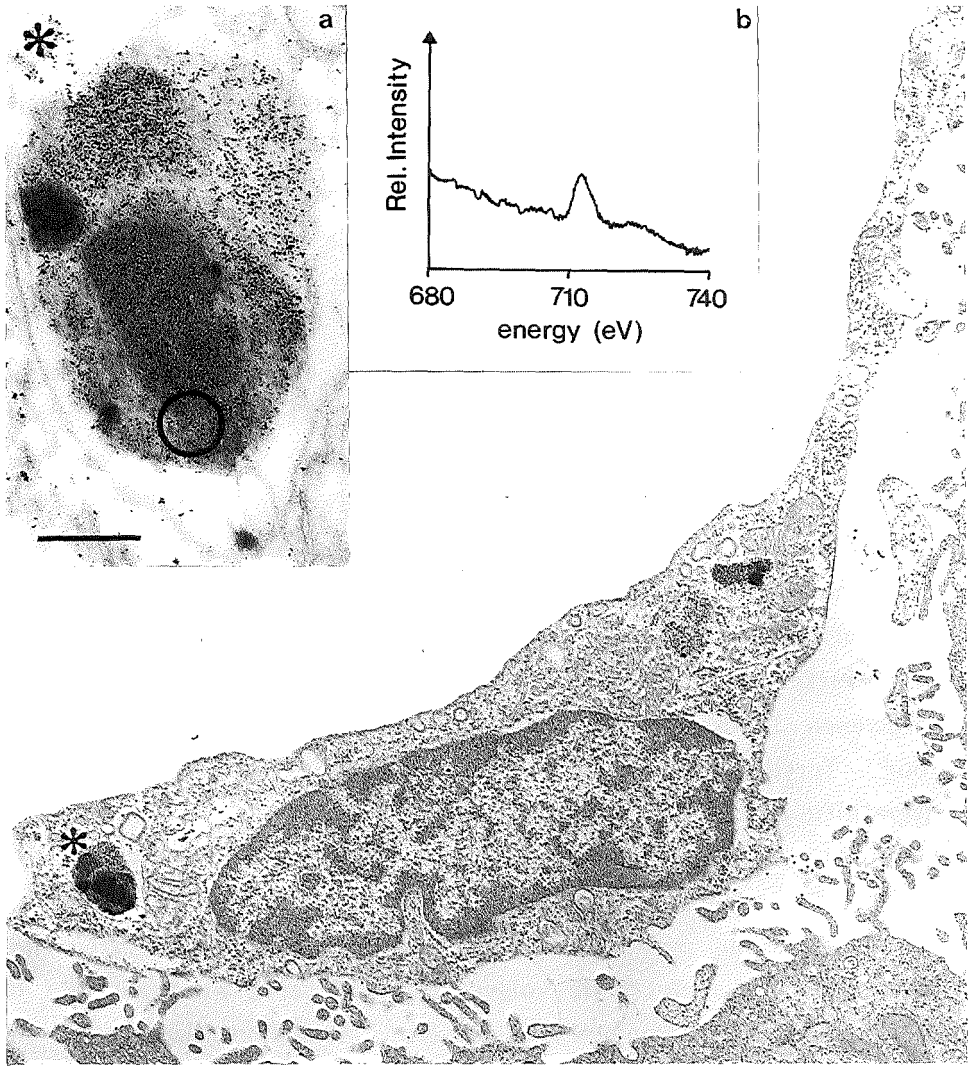
Het ferritinegehalte in de lever en milt werd in de tijd gevolgd met behulp van biochemische analysetechnieken. In Tabel II is te zien dat het ferritinegehalte in de lever en milt van ijzeroverladen ratten hoger is dan dat van normale ratten. Na herhaalde flebotomie daalt het ferritinegehalte in de milt van normale ratten snel (Tabel II). Deze resultaten zijn in overeenstemming met die van Hultcrantz⁵ die vond dat na flebotomie het ijzergehalte van de milt daalde tot 10%. Een zelfde afname werd ook gezien bij de ijzeroverladen ratten zij het wat later in het proces. Dit fenomeen kan worden verklaard door de (te?) korte rustperiode tussen de laatste Imferon-injectie en de orbitapuncties. Mogelijk wordt het in hemoglobine ingebouwde ijzer aanvankelijk gebruikt uit het ijzerdepot, dat op dat moment resp. ijzerdextraan op de injectieplaats, en in het plasma circulerend ijzerdextraan is. Het ferritinegehalte in de lever van zowel normale

als ijzeroverladen ratten toonde een veel geleidelijker afname. Blijkbaar reageren de macrofagen van de milt veel actiever op een verhoogde vraag naar ijzer dan de levercellen.

Gegevens van Tabel III laten zien dat de ferritine-ijzersaturatie een hoge intraspecies variabiliteit vertoont wat in overeenstemming is met eerder gepubliceerde resultaten^{20,21,22}. Deze waarden veranderden niet significant na herhaalde flebotomie. Wij veronderstellen voor dat gedurende de herhaalde flebotomie ferritine in zijn geheel wordt afgebroken. Dit komt overeen met eerder gepubliceerde resultaten van Cleton et al.¹² die bij hemochromatose-patiënten geen verandering in Fe/P-ratio van lysosomale ijzeropslagverbindingen zagen vòòr en na flebotomie. Hieruit werd geconcludeerd dat hele ferritinemoleculen werden afgebroken en verdwenen uit de lysosomen van de lever. Zuyderhoudt et al.²³ vonden een accumulatie van zowel ferritine eiwit als ferritineijzer in de eerste 4 uur na i.v. toediening van ratteleverferritine. Zowel ferritine (eiwit) als ferritineijzer verdwenen binnen 24 uur uit de lysosomen, hetgeen indicatief is voor ferritinecatabolisme in combinatie met gelijktijdige ijzerafgifte uit dit compartiment.

Electronen spectroscopische methoden (ESI en EELS) werden gebruikt als additionele techniek; EELS om de distributie van ijzerdeeltjes in de verschillende celtypes en celcompartimenten gedurende de flebotomie te volgen. Het ESI-beeld werd gebruikt om het celtype te herkennen en de electronendichte ijzerkernen met een grootte van ± 6 nm in ongekleurde coupes te vinden. De ijzerkernen in het cytoplasma en de lysosomen van lever- en miltcellen bleken omgeven te zijn door een fijn halo. De aanwezigheid van ijzer werd vervolgens bevestigd met behulp van EELS (inset fig. 2 en 3, fig. 4a-c). Uit deze gegevens concluderen wij dat de waargenomen deeltjes ferritine voorstellen, hoewel het niet uitgesloten kan worden dat in de lysosomen een deel van het ferritine omgezet is in hemosiderine.

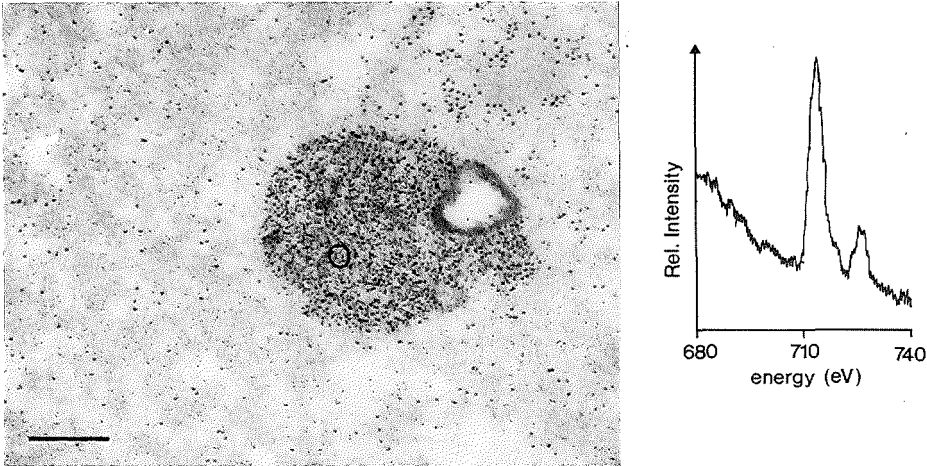
De lysosomen en het cytoplasma van de miltcellen en alle levercellen van zowel normale als ijzer-overladen ratten bevatten



figuur 2.

ESI-beeld bij $\Delta E=0$ eV. Leverendotheelcel van een normale rat (geosmificeerd, ongekleurde coupe, $M=132.000 : 1$).

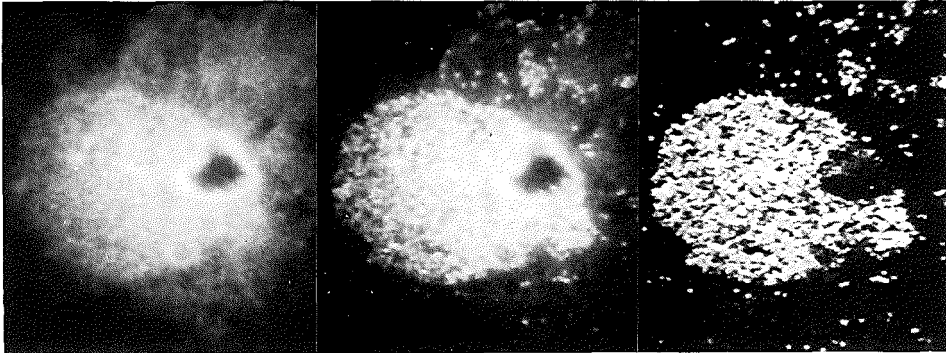
Inzet a: *Lysosoom ($M=30.000 : 1$). Inzet b: Detectie van Fe-L_{2,3} in het lysosoom bij $\Delta E=714$ eV. De cirkel in het lysosoom stelt het geanalyseerde gedeelte voor. Het streepje is $0.5 \mu\text{m}$.



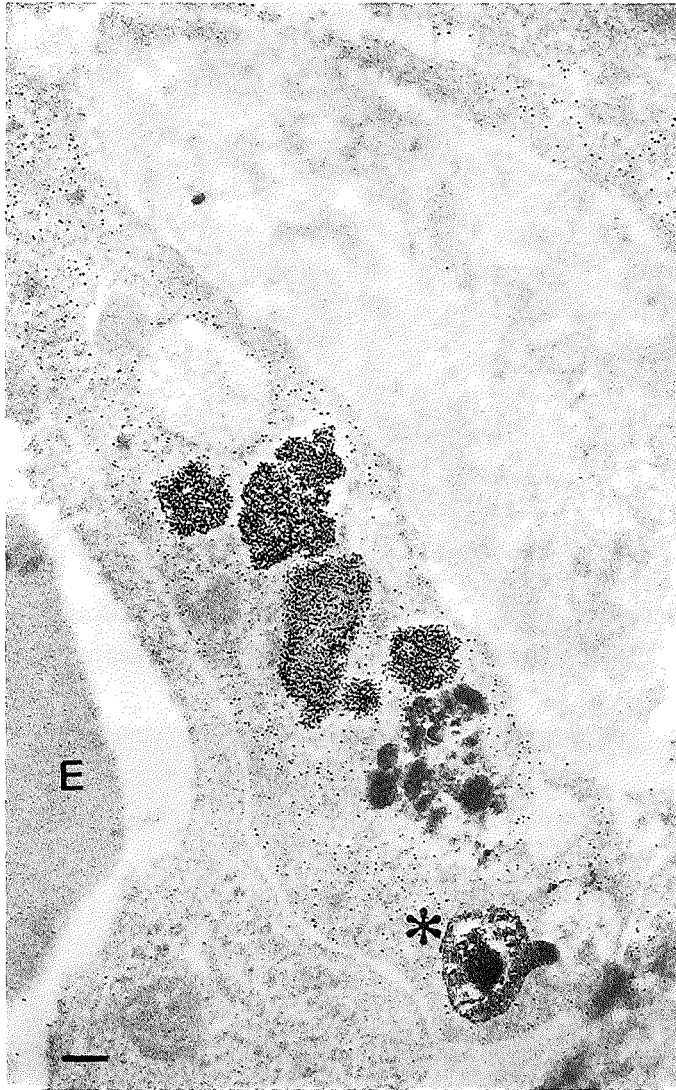
figuur 3.

ESI-beeld bij $\Delta E=0$ eV. Hepatocyt van een ijzeroverladen rat (geosmificeerd, ongekleurde coupe, $M=30.000 : 1$). Lysosoom met ferritine.

Inzet: Detectie van $\text{Fe-L}_{2,3}$ in het lysosoom bij $\Delta E=714$ eV. De cirkel in het lysosoom stelt het geanalyseerde gedeelte voor. Het streepje is $0.5 \mu\text{m}$.

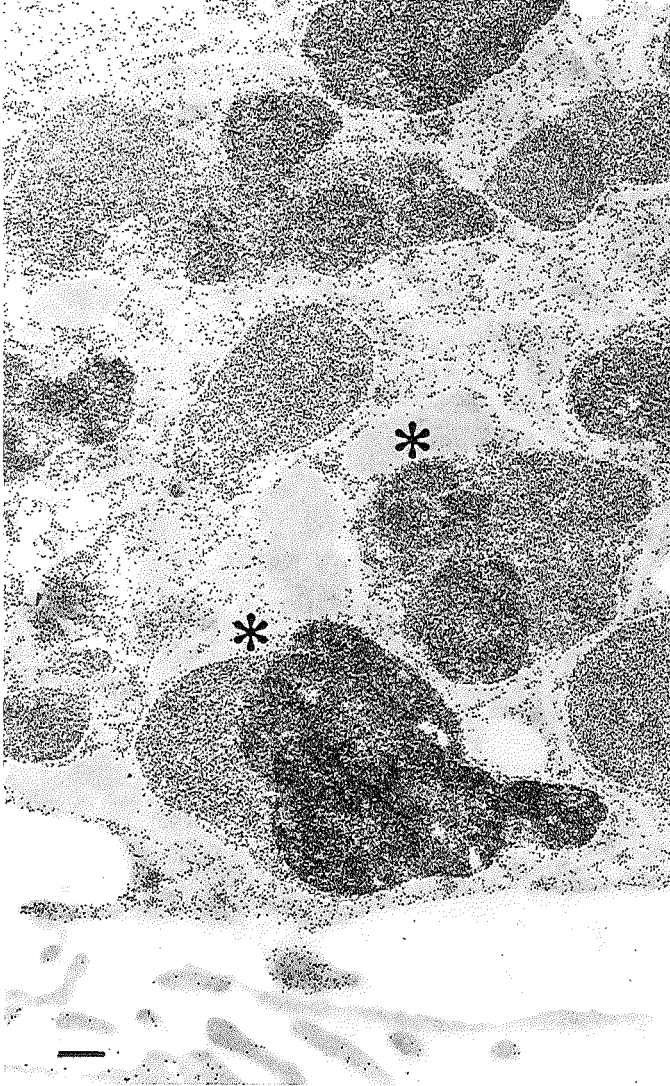


figuur 4a. Lysosoom van figuur 3. Aspecifiek EELS-beeld bij $\Delta E=690$ eV.
 4b. Lysosoom van figuur 3. Specifiek EELS-beeld bij $\Delta E=714$ eV.
 4c. Lysosoom van figuur 3. Netto Fe-distributiebeeld verkregen door aftrekken van de beelden van figuur 4a en 4b.



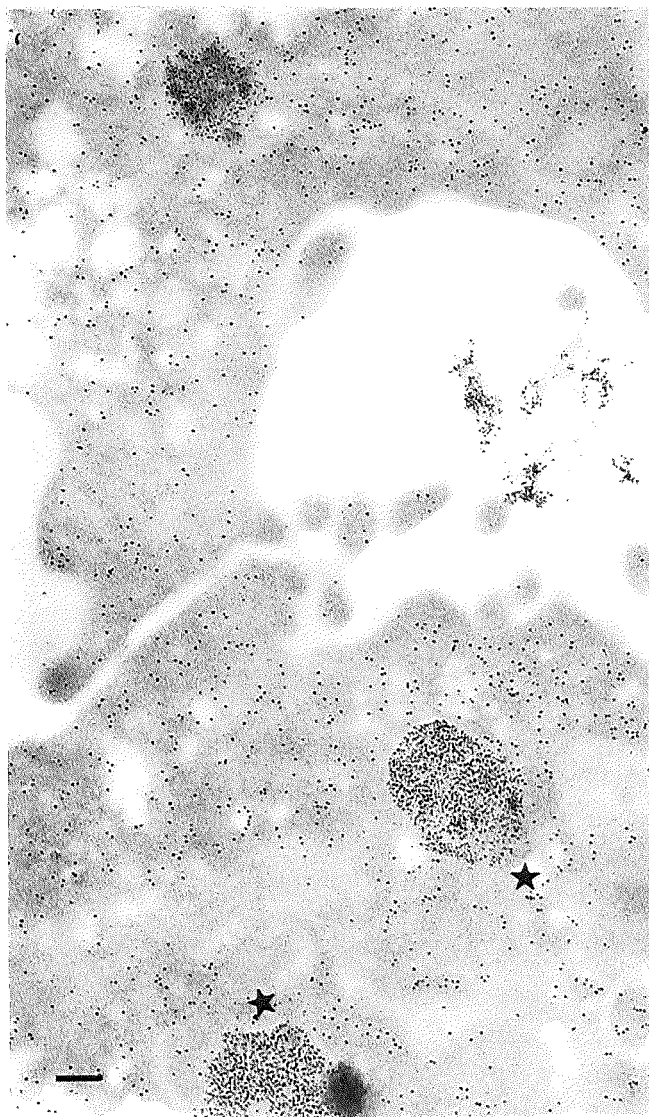
figuur 5.

ESI-beeld bij $\Delta E=0$ eV. Miltmacrofaag van een ijzeroverladen rat vòòr flebotomie (geosmificeerd, ongekleurde coupe, $M= 12.000 : 1$). *Lysosoom met onregelmatig gestapeld ferritine. E= erythrocyt. Het streepje is $0.5 \mu\text{m}$.



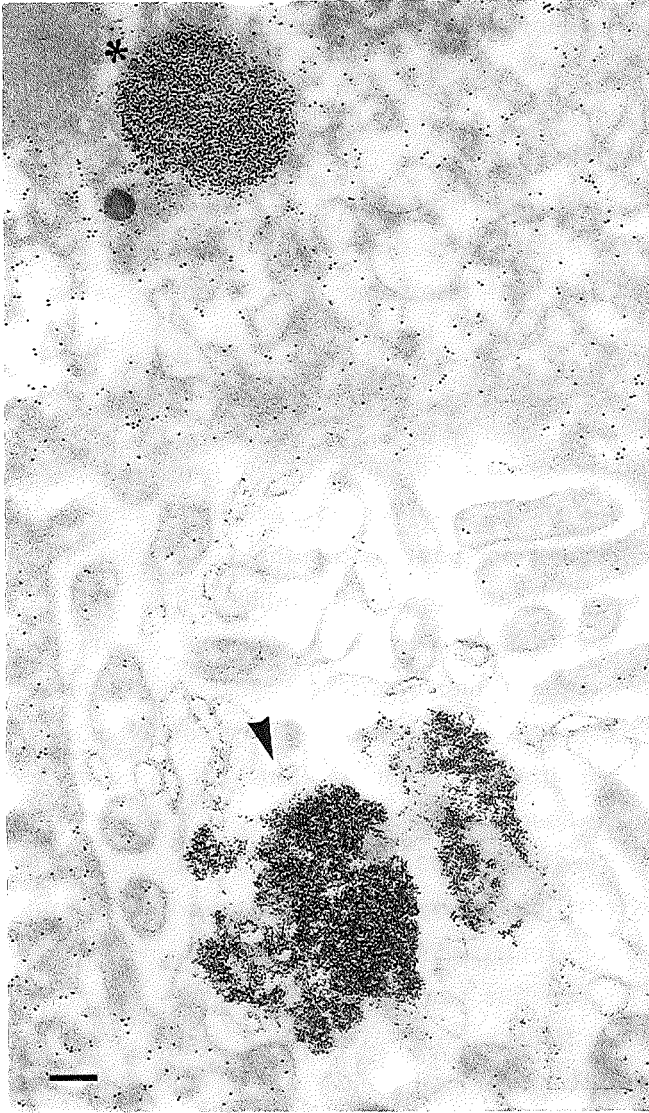
figuur 6.

ESI-beeld bij $\Delta E=0$ eV. Kupffercel van een ijzeroverladen rat vòòr flebotomie (geosmificeerd, ongekleurde coupe, $M= 12.000 : 1$). *Lysosoom met onregelmatige pakkingsdichtheid. Het streepje is $0.5 \mu\text{m}$.



figuur 7.

ESI-beeld bij $\Delta E = 0$ eV. Leverparenchymcel van een ijzeroverladen rat vòòr flebotomie (geosmificeerd, ongekleurde coupe, $M = 12.000 : 1$). ★ Peribillair gelokaliseerd lysosoom met regelmatig gestapeld ferritine. Het streepje is $0.5 \mu\text{m}$.



figuur 8.

ESI-beeld bij $\Delta E=0$ eV. Leverparenchymcel van een ijzeroverladen rat na onttrekking van 5x4 ml bloed (geosmificeerd, ongekleurde coupe, $M=12.000:1$).

†Ferritinedeeltjes in het lumen van een galgang. *Peribiliair gelokaliseerd lysosoom met ferritine. Het streepje is $0.5\ \mu\text{m}$.

ijzerdeeltjes (fig. 2,3,5,6,7). Dit is in overeenstemming met resultaten van van Berkel et al.²⁴, die aantoonde dat 50% van het aan transferrine gebonden ijzer dat aan de lever wordt aangeboden, wordt opgenomen door de sinusoïdale cellen en 50% door de parenchymcellen via receptor-gemedieerde endocytose. Onze ultrastructurele waarnemingen zijn niet in overeenstemming met een studie van Hultcrantz²⁵ die vond dat leverendotheelcellen bij ijzeroverlading geen ijzerdeeltjes bevatten. Onze resultaten zijn ook in tegenspraak met die van Doolittle²⁶ en Bonkowsky²⁷ die vonden dat alleen de lysosomen van endotheelcellen ijzerdeeltjes bevatten. Deze verschillen kunnen mogelijk worden verklaard door verschillen in electronen-microscopische methoden die bij de studies zijn gebruikt.

Wanneer normale en ijzeroverladen ratten gedurende de periode dat ijzer wordt onttrokken worden vergeleken, zien wij in beide groepen een afname in pakkingsdichtheid van het ferritine in de macrofagen van de milt en de sinusoïdale cellen van de lever. Een zelfde afname was ook te zien in de leverparenchymcellen van normale ratten. Deze morfologische gegevens ondersteunen de biochemische gegevens en lijken de veronderstelling te rechtvaardigen dat ferritinemoleculen in hun geheel worden afgebroken wanneer er een verhoogde vraag naar ijzer is.

Wanneer het ferritinemolecuul inderdaad een deeltje is dat in zijn geheel verdwijnt als gevolg van herhaalde flebotomie, is het zinvol om een morfometrische studie uit te voeren op lysosomaal en cytoplasmatisch ferritine zoals eerder is gedaan door van der Kwast²⁸ voor colloïdaal goud. De bevinding dat het ferritine uit de leverparenchymcel onder onze experimentele omstandigheden niet verdwijnt kan dan op een meer kwantitatieve basis gestaafd worden.

Met betrekking tot de in de inleiding gestelde vragen kunnen wij het volgende concluderen:

1. De cellen betrokken bij de ijzeropslag en ijzermobilisatie zijn miltmacrofagen, leversinusoïdale en -parenchymcellen.

2. Gedurende flebotomie neemt het lysosomale ferritine in milt- en levermacrofagen af terwijl het in leverparenchymcellen gelijk blijft of zelfs lijkt toe te nemen.
3. Een excretie van (lysosomaal?) ferritine is waargenomen in de galkanalen.

Deze waarnemingen leiden ertoe te veronderstellen dat er 2 verschillende mogelijkheden zijn waarmee ijzer wordt gemobiliseerd wanneer er een verhoogde vraag naar ijzer is. De ene is een directe route waarbij miltmacrofagen, levermacrofagen en leverendotheelcellen (beide sinusoidale levercellen) actief reageren door ferritine in zijn geheel te cataboliseren waarbij ijzer gelijktijdig vrijkomt voor de heemsynthese. Een andere route, mogelijk een langzamere, gaat vermoedelijk via de parenchymale cellen die vervolgens intacte ferritinemoleculen in de gal uitscheiden of na degradatie van ferritine, ijzer afgeven voor heemsynthese.

Het exacte mechanisme dat ten grondslag ligt aan het proces van ijzermobilisatie blijft nog steeds onzeker en moet derhalve uitgebreider worden onderzocht.

Literatuur

- 1 Harrison, P.M. Ferritin: an iron-storage molecule. *Sem. in Haemat.* 14, 55, 1977.
- 2 Hoy, T.G., Jacobs, A. Ferritin polymers and the formation of haemosiderin. In: *The biochemistry and physiology of iron*, edited by P. Saltman and J. Hegener, p. 435, Elsevier North-Holland Inc., 1982.
- 3 Wixom, R.L., Prutkin, L., Munro, H.N. Haemosiderin, nature, formation, and significance. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 22, 193, 1980.
- 4 Trump, B.F., Valigorsky, J.M., Arstilla, U., Mergner, W.J., Kinney, T.D. The relationship of intracellular pathways of iron metabolism to cellular iron overload and the iron storage diseases. *Am. J. Path.* 72, 295, 1973.
- 5 Hultcrantz, R., Glaumann, H. Studies on rat liver following iron overload. *Lab. Invest.* 46, 383, 1982.
- 6 Iancu, T.C., Lichterman, L., Neustein, H.B. Hepatic sinusoidal cells in iron overload. *Israel J. Med. Sci.* 14, 1191, 1978.
- 7 Arborgh, B.A.M., Glaumann, H., Ericsson, J.L.E. Studies on iron loading of rat liver lysosomes. *Lab. Invest.* 30, 664, 1974.
- 8 Bradford, W.D., Elchlepp, J.G., Arstilla, A.U., Trump, B.F., Kinney, T.D. Iron metabolism and cell membranes. *Am. J. Path.* 56, 201, 1969.
- 9 Osaki, S., Sirivech, S. Identification and partial purification of ferritin reducing enzyme in liver. *Fed. Proc. Amer. Soc. Exp. Biol.* 30, abstract 1292, 1971.
- 10 Baker, E., Page, M., Morgan, E.H. Transferrin and iron release from rat hepatocytes in culture. *Am. J. Physiol.* 11, G93, 1985.
- 11 Mostert, L.J., de Jong, G., Koster, J.F., van Eijk, H.G. Iron mobilization from isolated hepatocytes. *Int. J. Biochem.* 18, 1061, 1986.
- 12 Cleton, M.I., Sindram, J.W., Rademakers, L.H.P.M., Zuyderhoudt, F.M.J., de Bruijn, W.C., Marx, J.J.M. Ultrastructural evidence for the presence of ferritin iron in the biliary system of patients with iron overload. *Hepatology* 6, 30, 1986.
- 13 Penders, T.J., de Rooij-Dijk, H.H., Leijnse, B. Rapid isolation of ferritin by means of ultracentrifugation. *Biochim. Biophys. Acta* 168, 588, 1968.
- 14 Markwell, M.A.K., Haas, S.M., Bieber, L.L., Tolbert, N.E. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analyt. Biochem.* 87, 206, 1978.

- 15 Mancini, G., Carbonara, A.O., Heremans, J.F. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 2, 235, 1965.
- 16 Hezel, U.B., Bauer, R. Zeiss Information, MEM Oberkochen 5, 28, 1987.
- 17 Ottensmeyer, F.P., Andrew, J.W. High-resolution microanalysis of biological specimens by electron energy loss spectroscopy and by electron spectroscopic imaging. *J. Ultr. Res.* 72, 336, 1980.
- 18 Bauer, R. Zeiss Information, MEM 5, 10, 1987.
- 19 Oost, B.A. van, Beld, B. van den, Asbeck, B.S. van, Marx, J.J.M. Monitoring of intensive phlebotomy therapy in iron overload by serum ferritin assay. *Am. J. Hemat.* 18, 7-12, 1985.
- 20 Myagkaya, G.L., de Bruijn, W.C. X-ray microanalysis of cellular localization of ferritin in mammalian spleen and liver. *Micron* 13, 7 1982.
- 21 Crichton, R.R. The biochemistry of ferritin. *Brit. J. Haemat.* 24, 677, 1973.
- 22 Fischbach, F.A., Anderegg, J.W. An X-ray scattering study of ferritin and apoferritin. *J. Mol. Biol.* 14, 458, 1965.
- 23 Zuyderhoudt, F.M.J., Uiterdijk, H.G., Jorning, G.G.A. On the role of rat liver lysosomes in the catabolism of intravenously injected rat liver ferritin. In: *The biochemistry and physiology of iron.* editor P. Saltman en J. Hegenauer., p 470, Elsevier North-Holland, Inc. 1982.
- 24 Berkel, Th.J.C. van, Dekker, C.J., Kruijt, K., Eijk, H.G. van The interaction in vivo of transferrin and asialotransferrin with livercells. *Biochem. J.* 243, 715, 1987.
- 25 Hultcrantz, R. Studies on rat liver following iron overload. *Acta Path. Microbiol. Scand. sect. A*, 91, 125-132, 1983.
- 26 Doolittle, R.L., Richter, G.W. Isolation and culture of Kupffer cells and hepatocytes from single rat livers. *Lab. Invest.* 45, 558, 1981.
- 27 Bonkowsky, H.L., Carpenter, S.J., Healey, J.F. Iron and the liver, *Arch. Path. Lab. Med.* 103, 21, 1979.
- 28 Kwast, Th. van der In: *Microscopic Codebook of pathology. The art of microscopic visualisation in pathology.* M.E. Boon en L.P. Kok eds., p. 156, Leiden, Coulomb Press Leyden, 1987.

Hoofdstuk 6

Hoofdstuk 6.

6.1. Algemene discussie

Het meeste ijzer in het lichaam is gebonden in hemoglobine terwijl de ijzervoorraden worden gevormd door ferritine en hemosiderine in de lever, milt en beenmerg.

Hepatocyten ontvangen hun ijzer voornamelijk via transferrine waarna het wordt ingebouwd in ferritine^{1,2}. Om het effect van verschillende verbindingen op het proces van ijzermobilisatie te bestuderen hebben wij als model, evenals andere onderzoeksgroepen op dit gebied^{3,4}, geïsoleerde rattehepatocyten gebruikt.

De opzet was om te onderzoeken welk mechanisme een rol speelt bij het proces van ijzermobilisatie. Er waren een aantal uitgangshypothesen:

- is apo-transferrine, een fysiologische verbinding, vanwege zijn hoge affiniteit voor ijzer in staat ijzer te mobiliseren?
- spelen reductieve processen een rol gezien het feit dat ijzer gemakkelijk door reducerende verbindingen uit ferritine gemobiliseerd kan worden?
- in hoeverre kan desferrioxamine, de enige klinisch gebruikte chelator, effectief ijzer mobiliseren en wat is het effect van ascorbinezuur?

In tegenstelling tot hetgeen Baker et al. (zie hoofdstuk 3) gevonden hebben, mobiliseert apo-transferrine in onze experimentele opzet geen ijzer uit hepatocyten. Ook Rama et al.⁵ vonden dat apo-transferrine niet in staat was om ijzer te mobiliseren uit hepatocyten (zelfs niet na 72 uur). Een duidelijke oorzaak voor dit verschil met Baker is niet aan te geven. Mogelijk spelen verschillen in experimentele condities (verschil in tijd tussen toediening van gemerkt ijzer aan het proefdier en het uitvoeren van het experiment) een rol. Als men mag veronderstellen dat ijzer uit intracellulair ferritine gemobiliseerd moet worden, dan lijkt het niet aannemelijk dat transferrine in staat is ijzer uit ferritine te mobiliseren. Ten eerste niet omdat onder fysiologi-

sche omstandigheden (intracellulair) ferritine en transferrine niet met elkaar in contact komen, ten tweede omdat in vitro transferrine zeer matig ijzer uit ferritine mobiliseert⁶.

Citraat (in zeer hoge concentratie) veroorzaakte in onze incubatie-experimenten de beste ijzermobilisatie waardoor de hypothese dat intracellulair reductie-equivalenten werden geproduceerd redelijk leek. Een andere wijze waarop intracellulair ook reductie-equivalenten geproduceerd konden worden was door toevoeging van ethanol aan het incubatiemedium, echter dit had geen verhoging van de ijzerafgifte uit hepatocyten tot gevolg. Mogelijk is er compartimentalisatie m.b.t. de compartimenten waar reductie-equivalenten worden geproduceerd of zijn alleen de chelerende eigenschappen van citraat belangrijk bij de waargenomen ijzermobilisatie in onze incubatie-experimenten. Daarom werd besloten om ook te kijken naar desferrioxamine (Desferal), een ijzerchelator die bij de behandeling van thalassemiepatiënten zijn nut reeds heeft bewezen. Vaak wordt deze chelator gecombineerd met ascorbinezuur waardoor in eerste instantie een verhoging van de ijzerexcretie wordt gezien⁷. In onze incubatie-experimenten veroorzaakte de combinatie van desferrioxamine met ascorbinezuur geen verhoogde ijzermobilisatie. Wel trad een verhoging van een intracellulaire laagmoleculaire fractie (Fe-chelatorcomplex, ferrioxamine) op, wat betekent dat ascorbinezuur wel in staat is om een verhoging van de ijzermobilisatie uit ferritine te veroorzaken (reductie van ferritine-ijzer) maar het gevormde ijzerchelatorcomplex komt slechts langzaam in de circulatie. Opgemerkt dient te worden dat wij ijzermobilisatie bestudeerden door middel van leverparenchymcellen (waaruit desferrioxamine zijn ijzer cheleert⁸) maar dat de waargenomen effecten (in het bijzonder voor ascorbinezuur) niet zonder meer door te trekken zijn naar reticuloendotheliale cellen.

Anemisch ratteserum gaf een verhoogde ijzermobilisatie te zien waar niet zonder meer een verklaring voor te vinden is. Mogelijk bevat anemisch serum een factor die ijzermobilisatie bevordert.

Factoren die de overdracht van ijzer uit (serum-) ferritine naar transferrine bevorderen zijn in de literatuur beschreven⁹.

Desferrioxamine is in staat ijzer uit het lichaam te verwijderen en wordt gebruikt bij de behandeling van β -thalassemie. Omdat er nogal wat nadelen zijn verbonden aan desferrioxamine wordt gezocht naar goedkope, oraal werkzame ijzerchelatoren die minstens even effectief zijn als desferrioxamine. In de periode waarin dit onderzoek werd uitgevoerd kwam een aantal nieuwe ijzerchelatoren in de belangstelling vanwege het feit dat zij oraal werkzaam en goedkoop waren. Van deze groep nieuwe ijzerchelatoren zijn een aantal essentiële eigenschappen onderzocht waaronder de ijzermobilisatie uit ferritine, de intracellulaire ijzerchelatie uit ferritine en de katalyse van microsomale lipide-peroxidatie door het gevormde ijzer-chelatorcomplex. Steeds meer wordt men zich ervan bewust dat bij ijzerstapeling het teveel aan ijzer "veilig" wordt opgeborgen in ferritine/hemosiderine waardoor het ijzer niet in staat is lipide-peroxidatie te katalyseren. Wanneer men nu tracht dit opgeslagen ijzer te mobiliseren met behulp van ijzerchelatoren al of niet gecombineerd met een reductor (ascorbinezuur) moet men zich er wel van overtuigen dat het gevormde laag-moleculaire ijzer-chelatorcomplex geen lipide-peroxidatie veroorzaakt wat voor de weefsels waar het overtollig ijzer is afgezet (lever, hart, pancreas) ernstige schade kan opleveren. Ons inziens is het ijzerchelator waarvan zijn ijzer-chelatorcomplex lipide-peroxidatie katalyseert, uitgesloten van verder (klinisch) onderzoek. De in hoofdstuk 4 besproken methode kan hulp bieden bij een eerste screening van nieuwe ijzerchelatoren.

Teneinde iets meer te weten te komen over de celtypen in de lever en de milt en de cellulaire compartimenten die betrokken zijn bij het proces van ijzermobilisatie, is een electronen-microscopische studie in combinatie met biochemische analyses gedaan. Er is getracht een "tijdsopname" te maken bij twee groepen ratten, een normale en een ijzer-overladen groep, gedurende de periode dat ijzer door middel van flebotomie werd verwijderd. Met een

nieuwe electronen-microscopische techniek^{10,11} (ESI, EELS) was het mogelijk beelden met een zeer hoge resolutie te verkrijgen.

Met behulp van de biochemische analyses werd geconcludeerd dat ferritine in zijn geheel werd afgebroken bij verhoogde vraag naar ijzer. Dit is door andere onderzoekers reeds eerder gesuggered^{12,13} en door ons op andere wijze nogmaals aangetoond.

Er was een ongelijke afname in milt- en levermacrophagen vergeleken met leverparenchymcellen gedurende flebotomie. Mogelijk trad een redistributie van ijzer op van de non-parenchymale cellen naar de parenchymcellen. Een snelle afname van ijzerdeeltjes in Kupffercellen vergeleken met parenchymcellen na ijzeronttrekking is ook reeds beschreven door Hultcrantz^{14,15}. De vraag blijft echter nog steeds in hoeverre de non-parenchymale cellen een actieve rol spelen bij de ijzermobilisatie, te meer omdat het meeste ijzer in de lever toch in de parenchymale cellen ligt opgeslagen. Mogelijke wegen voor ijzerafgifte door de parenchymale cellen zijn resp. afgifte van ferritine in de gal hetgeen ook door ons is waargenomen maar wat nog niet duidt op een proces dat fysiologisch van belang is en afgifte van ijzer aan de bloedbaan na degradatie van (lysosmaal) ferritine.

Concluderend kan worden gesteld dat het gebruik van electronen-microscopische technieken in combinatie met biochemische analysemethoden op dit ogenblik een goed hulpmiddel is bij het volgen van ferritine/hemosiderine in verschillende celtypen en -organellen gedurende het proces van ijzermobilisatie. Morfometrische analyses zijn noodzakelijk om bepaalde waarnemingen statistisch "hard" te maken.

Literatuur

- 1 Cook, J.D., Hersko, C. Finch, C.A. Storage iron kinetics. IV. Cellular distribution of ferritin iron stores in rat liver. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 151, 78, 1976.
- 2 Van Wijk, C.P., Linder-Horowitz, M., Munro, H.N. Effect of iron loading on non-haem iron compounds in different liver cell populations. *J. Biol. Chem.* 246, 1025, 1971.
- 3 Baker, E., Vicary, F.R., Huehns, E.R. Iron release from isolated hepatocytes. *Br. J. Haemat.* 47, 493-504, 1981.
- 4 Octave, J.-N., Y.-J. Schneider, Crichton, R.R., Trouet, A. Iron mobilization from cultured hepatocytes: effect of desferrioxamine B. *Biochem. Pharm.* 32, 3413-3418, 1983.
- 5 Rama, R. Octave, J.-N., Schneider, Y.-J., Sibille, J.-C., Limet, J.N., Marechal, J.-C., Trouet, A., Crichton, R.R. Iron mobilization from cultured rat fibroblasts and hepatocytes. *FEBS Lett.* 127, 204-206, 1981.
- 6 Harris, D.C. *Biochemistry* 17, 3071-3078, 1978.
- 7 Wapnick, A.A., Lynch, S.R., Charlton, R.W., Seftel, H.C., Bothwell, T.H. The effect of ascorbic acid deficiency on desferrioxamine-induced urinary iron excretion. *Br. J. Haemat.* 17, 563, 1969.
- 8 Hersko, C., Cook, J.D., Finch, C.A. Storage iron kinetics III. *J. Lab. Clin. Med.* 81, 876, 1973.
- 9 Jin, Y., Crichton, R.R. Iron transfer from ferritin to transferrin. Effect of serum factors. *FEBS Lett.* 215, 41-46, 1987.
- 10 Bauer, R. Zeiss Information, MEM 5, 10, 1987.
- 11 Hezel, U.B., Bauer, R. Zeiss Information, MEM Oberkochen 5, 28, 1987.
- 12 Zuyderhoudt, F.M.J., Uiterdijk, H.G., Jörning, G.G.A. On the role of rat liver lysosomes in the catabolism of intravenously injected rat liver ferritin. In: *The biochemistry and physiology of iron.* Editors P. Saltman and J. Hegenauer. Elsevier North-Holland, Inc. pp. 479-483, 1982.
- 13 Cleton, M.I., Frenkel, E.J., de Bruijn, W.C., Marx, J.M. Determination of iron to phosphorus ratios of iron storage compounds in patients with iron overload: a chemical and electron probe X-ray microanalysis. *Hepatology* 6, 848-851, 1986.
- 14 Hultcrantz, R., Högberg, J., Glaumann, H. Studies on rat liver following iron overload: an analysis of iron and lysosomal enzymes in isolated parenchymal and non-parenchymal cells. *Virchows Arch. (cell. pathol.)* 43, 67-74, 1983.

- 15 Hulcrantz, R., Arborgh, B., Wroblewski, R., Ericsson, J.L.E. Studies on rat liver during iron overload. Acta Path. Microbiol. Scand. sect. A. 88, 341-353, 1980,

Hoofdstuk 7

Hoofdstuk 7.

7.1. Samenvatting

Dit proefschrift beschrijft het onderzoek naar factoren die betrokken zijn bij het proces van ijzermobilisatie. Zowel van fysiologische verbindingen (transferrine, citraat) als van niet-fysiologische verbindingen (ijzerchelatoren) is onderzocht in hoeverre deze in staat waren in vitro ijzer te mobiliseren uit geïsoleerde rattehepatocyten en uit radioactief gemerkt ferritine. Van enkele nieuwe veel belovende ijzerchelatoren is onderzocht of hun ijzerchelator-complexen lipide-peroxidatie katalyseerden wat een reden kan zijn om de betreffende chelator niet toe te dienen aan patiënten met ijzerstapelingsziekten. Tevens is met behulp van biochemische analysetechnieken, gecombineerd met elektronen-microscopie onderzocht wat het effect van ijzeronttrekking d.m.v. flebotomie is op de verdeling van ijzer in de verschillende celtypen van de lever en de milt van zowel normale als ijzeroverladen ratten.

Hoofdstuk 1 geeft een kort overzicht van de ijzerstofwisseling en behandelt aspecten van de ijzermobilisatie in het kader van lipide-peroxidatie en ijzerstapelingsziekten.

Hoofdstuk 2 beschrijft een aantal bij dit onderzoek veel gebruikte methoden. Methoden die bij een specifiek deel van het onderzoek zijn gebruikt worden in de desbetreffende hoofdstukken beschreven.

Hoofdstuk 3 beschrijft het onderzoek naar factoren die betrokken zijn bij het proces van ijzermobilisatie. Getracht is door middel van incubatieexperimenten met geïsoleerde rattehepatocyten een idee te krijgen welke verbindingen effect hadden op de ijzerafgifte uit deze cellen. Het blijkt dat een aantal verbindingen een verhoogde ijzerafgifte kunnen bewerkstelligen, al blijft ijzermobilisatie een traag proces. Apo-transferrine dat in de literatuur beschreven wordt als een fysiologische verbinding die effectief de ijzerafgifte uit hepatocyten bevordert, bleek in onze

incubatieexperimenten niet effectief. Desferrioxamine (Desferal) dat wordt gebruikt bij patiënten met ijzerstapelingsziekten (β -thalassemie) kan ijzer uit hepatocyten mobiliseren, maar er blijft een aanzienlijke hoeveelheid (ijzer-chelatorcomplex) intracellulair achter wat slechts langzaam in het incubatiemedium terecht komt. Toevoeging van ascorbinezuur samen met desferrioxamine aan het incubatiemedium verhoogde alleen de intracellulaire ijzerafgifte maar had geen effect op de ijzerafgifte aan het incubatiemedium.

In hoofdstuk 4 worden een aantal nieuwe ijzerchelatoren vergeleken met desferrioxamine (Desferal). Desferrioxamine is op het ogenblik de enige ijzerchelator die klinisch wordt gebruikt bij patiënten met ijzeroverlading om overtollig ijzer te verwijderen. Desferrioxamine heeft een aantal nadelen. Ten eerste is de verbinding erg duur en dus niet te gebruiken in die landen waar β -thalassemie veelvuldig voorkomt. Ten tweede is de verbinding oraal onwerkzaam zodat de toediening dagelijks intramusculair, intraveneus of subcutaan dient te geschieden wat voor de (jeugdige) patiënt nogal belastend is. Om deze redenen wordt nog steeds gezocht naar nieuwe ijzerchelatoren die net zo effectief zijn als desferrioxamine maar goedkoop zijn en oraal werkzaam. Tevens is in dit hoofdstuk aandacht besteed aan de eigenschappen van de verschillende chelatoren wat betreft hun capaciteit om ijzer uit ferritine te mobiliseren, en in het bijzonder of het ijzer-chelatorcomplex niet in staat is de vorming van vrije zuurstofradicalen ($O^{\cdot-}_2$) en hydroxylradicalen (OH^{\cdot}) te katalyseren. Hydroxylradicalen zijn enorm reactief en veroorzaken lipideperoxidatie hetgeen leidt tot ernstige weefselbeschadiging. Uiteindelijk bleef van een serie nieuwe ijzerchelatoren een tweetal over die aan de gestelde eisen voldeden resp. L1 en Mimosine. Verder klinisch onderzoek voor deze oraal toe te dienen ijzerchelatoren is momenteel in volle gang.

In hoofdstuk 5 wordt een serie experimenten beschreven met normale en ijzeroverladen ratten waarbij kunstmatig door middel van herhaalde flebotomie ijzer aan het lichaam werd onttrokken waar-

door de heemsynthese wordt gestimuleerd. Hierbij wordt ijzer gemobiliseerd uit de ijzervoorraden en ingebouwd in hemoglobine. Er is geprobeerd antwoord te krijgen op de volgende vragen. Welke celtypen in de lever en milt zijn betrokken bij het proces van ijzermobilisatie, uit welke celorganellen wordt ijzer in de tijd gemobiliseerd, en is er sprake van reductieve ijzermobilisatie of wordt ferritine in zijn geheel afgebroken?

De celtypen die betrokken zijn bij het proces van ijzeropslag en -mobilisatie zijn miltmacrofagen, sinusoïdale en parenchymcellen van de lever. Geconcludeerd is dat ferritine in zijn geheel wordt afgebroken waarna het ijzer beschikbaar is voor inbouw in hemoglobine. Ook zijn aanwijzingen gevonden dat in leverparenchymcellen na flebotomie bij ijzeroverladen ratten het aantal ijzerkernen niet afneemt terwijl dit wel het geval is bij de sinusoïdale cellen. Dit zou betekenen dat eerst ijzer gemobiliseerd wordt uit de sinusoïdale cellen en pas daarna uit de parenchymcellen. Deze hypothese dient nog nader onderzocht te worden d.m.v. een morfometrische electronen-microscopische analyse.

7.2. Summary.

This thesis describes a study of factors which are involved in iron mobilization. Physiological compounds (apo-transferrin, citrate) as well as non-physiological compounds were investigated for their capacity to mobilize iron from isolated rat hepatocytes and from ^{59}Fe -labelled ferritin. The iron-chelator complexes of some new iron chelators were also examined for their ability to catalyze lipid-peroxidation, which could be a reason not to administer those iron chelators to patients with iron storage diseases. The effect of repeated phlebotomie on the distribution of iron in different cell types of the liver and spleen in normal and iron-loaded rats was investigated by electron microscopic techniques in combination with biochemical analyses.

Chapter 1 gives a brief survey of iron metabolism and deals with aspects of iron mobilization in the context of lipid-peroxidation and iron storage diseases.

Chapter 2 describes the materials and the methods used in this study. In some chapters further details of the methods are provided.

Chapter 3 considers which factors are involved in the process of iron mobilization. By means of incubation experiments compounds which could play a role in iron mobilization were studied. Some compounds were able to bring about iron mobilization. Iron mobilization however remained a slow process.

Apo-transferrin which has been described in literature as a physiological compound effective in iron mobilization did not mobilize iron in our experiments. Desferrioxamine (Desferal) which is used for the treatment of iron-overloaded patients (e.g. β -thalassemia) is able to mobilize iron from isolated hepatocytes, but a considerable amount iron remains (as iron-chelator complex) inside the cell and leaks slowly into the incubation medium. Adding ascorbic acid together with desferrioxamine to the incubation medium increased the intracellular iron mobilization

but did not influence the release of iron into the incubation medium.

In chapter 4 a series of new chelators was compared to desferrioxamine. Desferrioxamine is at the moment the only chelator which is used clinically for patients with iron overload to remove the excess of iron. Desferrioxamine has a number of disadvantages. Firstly the compound is very expensive and for that reason not useful in those countries in which β -thalassemia occurs frequently. Secondly desferrioxamine is not active when administered orally, and has to be administered parenterally (s.c. or i.m.) which is very unpleasant especially for young adolescent patients. For these reasons it was necessary to investigate new iron chelators which are as effective as desferrioxamine but which are cheap and orally effective.

In this chapter attention has also been paid to the capacity of these new iron chelators to mobilize iron from ferritin, and especially to the property that the iron-chelator complex might be able to catalyze the formation of free oxygen radicals ($O^{\cdot-}_2$) and hydroxyl radicals (OH^{\cdot}). Hydroxyl radicals are very reactive and cause lipid peroxidation which brings about severe tissue damage. In our experiments only two new iron chelators resp. L1 and Mimosine satisfied our criteria. Clinical studies to these iron chelators are being performed at present.

In chapter 5 experiments are described with normal and iron overloaded rats, during which iron has been artificially withdrawn from the body by repeated phlebotomies. Haem synthesis is stimulated and iron mobilized from its stores to be incorporated into haemoglobin. We tried to answer the following questions: which cell types in the liver and spleen are involved in the process of iron storage and mobilization? from which cell organelles is ferritin iron mobilized? and are we concerned with reductive iron mobilization or with degradation of ferritin in toto?

The cells involved in iron storage and mobilization are spleen macrophages, liver sinusoidal cells and parenchymal cells. We concluded that ferritin is degraded in toto with a concomitant

release of iron used for haem synthesis. There are indications that in liver parenchymal cells the number of iron containing particles does not decrease after repeated phlebotomy, as it does in hepatic sinusoidal cells. This means that iron is first mobilized from the sinusoidal cells and then from the parenchymal cells. This hypothesis has to be investigated with a morphometric electron microscopic analysis.

Nawoord

Hierbij wil ik graag iedereen bedanken die een bijdrage heeft geleverd aan de totstandkoming van dit proefschrift.

Met name wil ik bedanken:

Mijn promotor, Prof. dr. H.G. van Eijk, met bijzonder veel plezier heb ik de afgelopen jaren aan dit onderdeel van de ijzerstofwisseling gewerkt. Uw "ijzersterke" wijze van begeleiden heb ik bijzonder op prijs gesteld. U hebt mij altijd veel vrijheid gegeven en misschien is dat ook de reden waarom dit proefschrift (even) op zich heeft laten wachten.

Mijn promotor Prof. dr. J.F. Koster, uw goede ideeën en kritische opmerkingen waren onmisbaar tijdens dit onderzoek. De uren die wij gezamenlijk over de resultaten hebben gediscussieerd leken altijd veel meer vragen op te werpen dan dat er antwoorden werden gevonden.

De overige leden van de promotiecommissie, Prof. J.H.P. Wilson en Prof. dr. J. van Gool die het manuscript kritisch hebben beoordeeld.

Prof. dr. B. Leijnse voor de genoten gastvrijheid op de afdeling Chemische Pathologie. Ik hoop dat ik nog een aantal jaren van uw gastvrijheid op de afdeling Klinische Chemie van het AZR-Dijkzigt gebruik mag maken en nog vele indringende gesprekken met u mag hebben over de toekomst van de Klinische Chemie.

Dr. M.I. Cleton, Maud, voor de speedcursus "electronen-microscopie voor beginners" en de gezellige en leerzame uren in het donker.

De HLO-stagiaires, Peter Nieuwenhuizen, Ruud van Gorp, Hans van Dorst en Peter van Beers voor de prettige samenwerking en het werk dat jullie voor dit onderzoek hebben verricht.

Jan Kruis voor het altijd op tijd bestellen van de benodigde chemicaliën.

Ben van Bloppoel voor het verzorgen van de vele ratten die voor dit onderzoek zijn gebruikt.

De overige medewerkers van de afdeling Chemische Pathologie voor de gezellige tijd.

Ed Giskes voor het 's avonds ter beschikking stellen van de HP Laserjet, het aanleveren van WP 5.0 en diverse fonts.

Tenslotte wil ik mijn ouders bedanken voor de gelegenheid die zij mij hebben geboden om te studeren en voor de belangstelling die zij altijd hebben getoond voor mijn onderzoek.

Hanneke, jouw stimulerende invloed en leuke ideeën waren vooral de laatste tijd onmisbaar en hebben deze promotie tot een waar feest gemaakt.

Curriculum vitae

De schrijver van dit proefschrift werd op 27 november 1958 te Maassluis geboren. Na het behalen van het Atheneum B diploma aan de Christelijke Scholengemeenschap "de Lage Waard" te Papendrecht werd in 1977 begonnen met de studie Farmacie aan de Rijks Universiteit Utrecht. Naast het hoofdvak Farmacie werd het bijvak Klinische Chemie (Prof. dr. J.B.J. Soons) gevolgd. Op 27 november 1984 werd het doctoraalexamen behaald.

Van 1 oktober 1984 tot 1 oktober 1987 was hij aangesteld als wetenschappelijk assistent bij de vakgroep Chemische Pathologie van de Faculteit der Geneeskunde van de Erasmus Universiteit Rotterdam en werd het in dit proefschrift beschreven onderzoek uitgevoerd.

Vanaf 1 oktober 1987 is hij als assistent klinisch chemicus werkzaam op de afdeling Klinische Chemie van het Academisch Ziekenhuis "Dijkzigt" te Rotterdam. Sinds 1 augustus 1988 is hij op dezelfde afdeling in opleiding tot klinisch chemicus (opleider Prof. dr. B. Leijnse).